



**Vera Mónica
Sousa Isca**

***Salicornia ramosissima* J. Woods: Estudo
fitoquímico das partes aéreas**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Vera Mónica
Sousa Isca**

***Salicornia ramosissima* J. Woods: estudo
fitoquímico das partes aéreas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, Ramo de Química Orgânica e Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica das Doutoradas Diana C.G.A. Pinto, professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Ana M. L. Seca, professora auxiliar do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento da Universidade dos Açores.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo seu incansável apoio...

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Luís Manuel Mira Vieira

professor auxiliar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutora Helena Abreu Silva

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Loureiro Seca

professora auxiliar do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento da Universidade dos Açores

agradecimentos

Em primeiro lugar desejo expressar o meu mais sincero reconhecimento às Professoras Doutoradas Diana Pinto e Ana Seca, orientadoras desta dissertação. Agradeço a sua valiosa orientação científica, os ensinamentos que me transmitiram ao longo deste trabalho, a sua disponibilidade, tranquilidade, amizade e a confiança que depositaram em mim, mesmo quando tudo parecia perdido.

Ao Professor Doutor Artur Silva, Professor Catedrático do grupo de disciplinas de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coordenador da Unidade de Investigação QOPNA, quero agradecer todos os experientes ensinamentos de Química Orgânica que me transmitiu ao longo do meu percurso académico na U.A., os quais foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. Obrigada pela sua constante disponibilidade, ajuda e amizade.

Ao Lic. Hilário Tavares e à Lic. Cristina Barros agradeço a disponibilidade na obtenção dos espectros de RMN e de EM, respetivamente.

Ao grupo de investigação de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro agradeço a ajuda e ensinamentos que de todos sempre recebi, sempre que precisei. Agradeço em especial aos meus colegas de laboratório, companheiros desta viagem, pelo espírito de entajuda, amizade e pelo bom ambiente de trabalho.

Ao Professor Doutor Armando Silvestre, Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro agradeço a disponibilização do aparelho de GC-MS, essencial para os estudos realizados neste trabalho.

Ao Doutor Rui Domingues e à Mestre Patricia Ramos agradeço a incansável disponibilidade e inúmeras dicas experimentais sobre o equipamento de GC-MS.

Ao Centro de Investigação em materiais Cerâmicos e Compósitos da Universidade de Aveiro quero agradecer a ajuda, sempre que precisei, em especial aos meus colegas de laboratório.

Ao Lic. José M. G. Pereira agradeço as fotografias originais de *Salicornia ramosissima* na Ria de Aveiro (Ecomuseu da Troncalhada).

À Ilha dos Puxadoiros (Ria de Aveiro) pela cedência da *Salicornia ramosissima*.

Aos meus amigos e companheiros que sempre acreditaram em mim. Apesar da enorme distância estiveram sempre presentes quando mais foram precisos e mesmo quando tudo parecia perdido nunca duvidaram das minhas capacidades. Obrigado Algarve! Em especial à Débora Simão, à Andreia Henrique, à Susana Gama, ao Remy Contreiras e ao José Estrela.

Às pessoas que cruzaram o meu percurso académico pelo Portugal fora e que, de uma maneira ou de outra, foram importantes para a minha aprendizagem e desenvolvimento pessoal e social, agradeço todo o apoio e bons momentos proporcionados, em especial ao Fábio Xavi, Nuno Silva, Bernardo Pires, João Constantino, David Sousinha, Frederico Silva, Diogo Pereira e Tiago Lopes.

Aos meus companheiros do mestrado agradeço toda a compreensão, paciência e apoio que os caracterizou durante o percurso que nos juntou. Obrigado Nádía Cruz, Stephanie Leal, Pedro Varandas, Hugo Santos e a todos os restantes.

Ao Ruben Rodrigues agradeço toda a compreensão, carinho, apoio e amor que me tem dado ao longo deste período conturbado. Obrigado por teres entrado assim na minha vida e a teres voltado de pernas para o ar, afinal era isso mesmo que precisava para encontrar o caminho para a felicidade.

À minha prima Katy por toda a inspiração que ela me proporciona quando me dá o prazer da sua companhia! E claro ao meu primo Miguel por ser uma fonte igualmente inspiradora.

A toda a minha família agradeço por me ensinarem desde sempre o valor da união familiar e por todo o apoio incondicional, carinho e compreensão apesar da enorme distância.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, os alicerces da minha felicidade, que sempre me educaram, apoiaram e incentivaram no sentido de alcançar os meus objetivos e os meus sonhos.

palavras-chave

Salicornia, *Salicornia ramosissima*, metabolitos secundários, caracterização estrutural, RMN, EM, GC-MS.

resumo

Salicornia ramosissima J. Woods (purple glasswort na Inglaterra ou erva salada em Portugal e Espanha) é uma planta do género *Salicornia* L. (Chenopodiaceae). Esta planta é uma halófita que se desenvolve em zonas marinhas, sendo encontrada abundantemente no sapal da Ria de Aveiro.

As plantas do género *Salicornia* são utilizadas pelos humanos desde a antiguidade, quer como alimento, quer na medicina tradicional. As plantas deste género são responsáveis por atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-hiperlipidémica, anti-hiperglicémica, antiproliferativa, antifúngica, antibacteriana e moduladora do sistema imunitário. Contudo, relativamente à espécie *S. ramosissima* pouco se conhece.

No âmbito deste trabalho estudou-se o extrato de hexano das partes aéreas de *S. ramosissima*, por GC-MS. Foram detetados e quantificados 57 compostos, maioritariamente, ácidos gordos saturados, insaturados, álcoois de cadeia longa e esteróis. Neste estudo avaliou-se, também, a influência que a quantidade de água utilizada na irrigação tem na produção de compostos lipofílicos. Detetou-se que, quando a planta é irrigada em excesso, há um aumento na produção de ésteres principalmente os que envolvem ácidos gordos saturados e diácidos, estando estes últimos quase exclusivamente na forma esterificada.

Estudou-se também o extrato de diclorometano das partes aéreas de *S. ramosissima*. Foram isolados e caracterizados dois novos compostos naturais, aos quais foram atribuídos os nomes triviais saliramofenol e saliramoester. Simultaneamente foi possível isolar e caracterizar a escopoletina pela primeira vez na espécie *S. ramosissima* e quatro compostos pela primeira vez no género *Salicornia*, o 2-hidroxicinamato de etilo, o (*E*)-ferulato de octadecanilo, o (*E*)-ferulato de eicosanilo e o triglicérido do ácido tetracosanóico.

keywords

Salicornia, *Salicornia ramosissima*, secondary metabolites, structural characterization, NMR, MS, GC-MS.

abstract

Salicornia ramosissima J. Woods (purple glasswort in England or herb salad in Portugal and Spain) is a *Salicornia* L. genus (Chenopodiaceae) plant. It's an halophyte that develops in marine zones, wildly spread in Ria de Aveiro.

Plants of the *Salicornia* genus are used by humans as food or traditional medicine since ancient times. Plants of this genus are responsible for biological activities such as antioxidant, anti-hyperlipidemic, anti-hyperglycemic, antiproliferative, antifungal, antibacterial and immune system modulator. However, for the *S. ramosissima* little is known.

Within this work we studied the hexane extract of the aerial parts of *S. ramosissima*, by GC-MS. We detected and quantified 57 compounds mainly saturated and unsaturated fatty acids, long chain alcohols and sterols. In this study was also evaluated the influence that the amount of water used in the irrigation has in the production of aliphatic compounds in the plant and, when excessively irrigated, it was detected an increase in the production of esters especially those involving saturated fatty acids and diacids, the latter being almost exclusively in esterified form.

On the other hand, were also isolated from the *S. ramosissima* aerial parts dichloromethane extract and characterized two new natural compounds, named saliramophenol and saliramoester. Furthermore, were also isolated and characterized scopoletine for the first time in *S. ramosissima* and four compounds new in the *Salicornia* genus, ethyl 2-hydroxycinnamate, octadecanyl (*E*)-ferulate, eicosanyl (*E*)-ferulate and triacylglycerol tetracosanoic acid.

Abreviaturas e símbolos

2-PrOH – 2-propanol

ABTS – Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

AcEt – Acetato de etilo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BSTFA – Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

BTH – Di-*terc*-butilmetilfenol

CAT – Catalase

CC – Cromatografia preparativa em coluna

CL – Cadeia lateral

COSY - Correlação espectroscópica homonuclear (bidimensional) em RMN

CYP – Enzima do citocromo P450

δ – Desvio químico (em ppm)

d – Duplete

dd – Duplo duplete

DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

E – Encharcado

E-H – Encharcado hidrolisado

EM – Espetrometria de massa

ESI+ – Ionização por electrospray em modo positivo

EtOH – Etanol

FAS – Ácidos gordos sintase

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa

GSH – Glutathione peroxidase na forma reduzida

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

Hex – Hexano

HMBC – Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância (bidimensional) em RMN

HO-1 – Heme oxygenase-1

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
 HSQC - Correlação espectroscópica heteronuclear (bidimensional) em RMN
 IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da atividade
 IFN- γ – Interferão- γ
 IL-1 β – Interleucina 1 β
 Int. rel. – Intensidade relativa
 IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
 LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
J – Constante de acoplamento (em Hz)
m – Multiplete
 M⁺• – Ião molecular
 [M-*n*]⁺ – Ião resultante da perda de *n* (u.m.a.) a partir da molécula inicial
 MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
 MDA – Malonaldeído
 MM – Massa molecular
 MMP – Metaloproteinase de matriz
 MOP – Mieloperoxidase
 MS-MS – Espectrometria de massa tandem
m/z – Razão massa/carga
 NE – Não encharcado
 NE-H – Não encharcado hidrolisado
 NOESY – Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser e de troca
 NOE – Efeito nuclear de Overhauser
 P.56 – Composto correspondente ao pico 56
 PI – Padrão interno
 ppm – Partes por milhão
 RMN – Ressonância magnética nuclear
 ROS – Espécies reativas de oxigénio
S. – *Salicornia*
 SAM – S-adenosilmetionina
 SOD – Superóxido dismutase
 SPE – Extração em fase sólida

SREBP-1c – proteína-1c de ligação do esterol

t – Tripleto

tlc – Cromatografia de camada fina

Tle – *terc*-leucina

TMS – Trimetilsililo

TMSCl – Cloreto de trimetilsililo

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TOF – Detetor de tempo de voo

Índice

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caracterização da espécie e género	1
1.2. Propriedades nutricionais do género <i>Salicornia</i>	5
1.3. Aplicações farmacológicas e tradicionais das espécies de <i>Salicornia</i>	9
1.4. Estudos fitoquímicos em espécies de <i>Salicornia</i> : compostos isolados.....	15
1.5. Ação biológica dos compostos isolados	29
 2. ANÁLISE DO EXTRATO DE HEXANO DAS PARTES AÉREAS DE <i>S.</i>	
 <i>RAMOSISSIMA</i>, POR GC-MS	35
2.1. Introdução	35
Fragmentos típicos de cada família de compostos identificados	36
a) Ácidos gordos saturados	36
b) Ácidos gordos insaturados	38
c) Diácidos	39
d) Álcoois.....	39
e) Esteróis.....	41
f) Compostos aromáticos	44
g) Alcanos	45
2.2. Caraterização dos extratos de hexano das partes aéreas de <i>S. ramosissima</i> , por GC-MS:	47
 3. ANÁLISE DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DAS PARTES AÉREAS DE <i>S.</i>	
 <i>RAMOSISSIMA</i>.....	61
3.1. Caraterização estrutural do composto A.....	62
3.2. Caraterização estrutural do Composto B	66

3.3. Caraterização estrutural do composto C.....	70
3.4. Caraterização estrutural do composto D.....	73
3.5. Caraterização estrutural do composto E.....	77
3.6. Caraterização estrutural do composto F.....	82
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.1 Reagentes, solventes, sílicas e equipamentos utilizados.....	89
Reagentes e solventes utilizados.....	89
Sílicas utilizadas.....	90
Equipamentos utilizados.....	90
4.2. Material vegetal	91
4.3. Obtenção dos extratos.....	92
4.4. Análise do extrato de Hexano, por GC-MS.....	93
Hidrólise alcalina	93
Sililação.....	94
Análise quantitativa.....	94
4.5. Análise do extrato de diclorometano.....	95
4.6. Dados espectroscópicos.....	97
Composto A: <u>(E)-2-hidroxicinamato de etilo</u>	97
Compostos B1 e B2: <u>(E)-ferulato de octadecanilo (B1) e (E)-ferulato de eicosanilo (B2)</u>	97
Composto C: <u>Escopoletina</u>	98
Composto D: <u>Triglicerídeo do ácido tetracosanóico</u>	98
Composto E: <u>Saliramofenol</u>	99
Composto F: <u>Saliramoester</u>	100
5. CONCLUSÃO.....	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Índice de figuras

FIGURA 1 – <i>S. RAMOSISSIMA</i> : A) HÁBITO E B) INFLORESCÊNCIA (ADAPTADO DE CASTROVIEJO ET AL. ^[11])	2
FIGURA 2 – <i>S. RAMOSISSIMA</i> : A) NA PRIMAVERA E B) NO OUTONO (FOTOGRAFADA POR JOSÉ M. G. PEREIRA)	3
FIGURA 3 – A) <i>S. RAMOSISSIMA</i> J. WOODS ^[20] E B) <i>S. EUROPAEA</i> L. ^[21]	4
FIGURA 4 – EXEMPLOS DE PLANTAS DO GÊNERO <i>SALICORNIA</i> L.: A) <i>S. RUBRA</i> , ^[52] B) <i>S. PERENNIS</i> , ^[53] C) <i>S. HERBACEA</i> , ^[54] D) <i>S. EUROPAEA</i> , ^[55] E) <i>S. BIGELOVII</i> , ^[56] F) <i>S. PACIFICA</i> , ^[57] G) <i>S. BRACHIATA</i> ^[58] E H) <i>S. VIRGINICA</i> ^[59]	7
FIGURA 5 – POSSÍVEIS MECANISMOS HIPOGLICÊMICOS E HIPOLIPIDÊMICOS DO EXTRATO DE ETANOL DE <i>S. HERBACEA</i> (ADAPTADO DE PARK ET AL., 2006) ^[90]	13
FIGURA 6 – COSMÉTICOS ANTI-ENVELHECIMENTO QUE CONTÊM <i>S. HERBACEA</i> NA SUA COMPOSIÇÃO ^[93,94]	14
FIGURA 7 – PIGMENTO RESPONSÁVEL PELA COLORAÇÃO AVERMELHADA	15
FIGURA 8 – METABOLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS A PARTIR DA <i>S. RAMOSISSIMA</i>	15
FIGURA 9 – CROMONAS ISOLADAS A PARTIR DE <i>S. EUROPAEA</i>	16
FIGURA 10 – DERIVADOS DE FLAVONOIDES ISOLADAS A PARTIR DE <i>S. EUROPAEA</i>	17
FIGURA 11 – SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS A PARTIR DE <i>S. EUROPAEA</i>	18
FIGURA 12 – EXEMPLOS DE ÁCIDOS GORDOS ISOLADOS A PARTIR <i>S. EUROPAEA</i>	18
FIGURA 13 – EXEMPLOS DE DERIVADOS DE ESTERÓIS ISOLADOS A PARTIR DE <i>S. EUROPAEA</i> E/OU <i>S. BIGELOVII</i>	19
FIGURA 14 – SAPONINAS RARAS ISOLADAS A PARTIR DE <i>S. BIGELOVII</i>	20
FIGURA 15 – SAPONINAS NORTRITERPENÓIDES E TRITERPENÓIDES ISOLADAS A PARTIR DE <i>S. BIGELOVII</i>	20
FIGURA 16 – NUTRIENTES ISOLADOS A PARTIR DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. BIGELOVII</i>	21
FIGURA 17 – CONSTITUINTES DO ÓLEO DAS SEMENTES DE <i>S. BIGELOVII</i>	21
FIGURA 18 – ESTERÓIS MAIS ABUNDANTES NAS SEMENTES DA FORMA SOS-7	22
FIGURA 19 – ÁCIDOS GORDOS IDENTIFICADOS NA <i>S. BRACHIATA</i>	22
FIGURA 20 – METABOLITOS ISOLADOS A PARTIR DA <i>S. FRUTICOSA</i>	23
FIGURA 21 – DERIVADOS DE FLAVONAS ISOLADOS A PARTIR DA <i>S. FRUTICOSA</i>	23
FIGURA 22 – EXEMPLOS DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NA <i>S. HERBACEA</i>	24
FIGURA 23 – ÁCIDO PALMITOLEICO, PRESENTE NA <i>S. HERBACEA</i>	24
FIGURA 24 – COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS A PARTIR DO EXTRATO DE METANOL/ÁGUA DE <i>S. HERBACEA</i>	25
FIGURA 25 – DERIVADOS DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ISOLADOS A PARTIR DE <i>S. HERBACEA</i>	26
FIGURA 26 – FLAVONOIDES GLICOSIDADOS, ISOLADOS A PARTIR DE <i>S. HERBACEA</i>	26
FIGURA 27 – GIPSOGENINAS ISOLADAS DE <i>S. HERBACEA</i>	27
FIGURA 28 – METABOLITOS ISOLADOS A PARTIR DO EXTRATO DE ACETONA DE <i>S. HERBACEA</i>	28
FIGURA 29 – ANTIOXIDANTE CONHECIDO	30
FIGURA 30 – FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS DO GRUPO DERIVATIZANTE, EM ÁCIDOS GORDOS SATURADOS-TMS	38
FIGURA 31 – FRAGMENTO CARACTERÍSTICO DOS DIÁCIDOS-TMS	39

FIGURA 32 – ESTRUTURA GERAL DE UM ESTEROL-TMS	42
FIGURA 33 – LOCAIS DE FRAGMENTAÇÃO PARA DAR ORIGEM AO IÃO COM m/z 257	42
FIGURA 34 – LOCAIS DE FRAGMENTAÇÃO PARA DAR ORIGEM AO IÃO COM m/z 215	43
FIGURA 35 – LOCAIS DE FRAGMENTAÇÃO DOS IÕES $[M-15]^+$, $[M-89-H]^+$, $[M-90-CH_3]^+$ E $[M-129]^+$	43
FIGURA 36 – FRAGMENTOS CARATERÍSTICOS DOS ALCANOS	46
FIGURA 37 – CROMATOGRAMA OBTIDO NA ANÁLISE POR GC-MS DO EXTRATO DE HEXANO DE <i>S. RAMOSISSIMA</i> NE-H	48
FIGURA 38 – ESTRUTURA DO CICLOARTENOL-TMS.....	50
FIGURA 39 – POSSÍVEIS ESTRUTURAS DO TRITERPENO NÃO IDENTIFICADO (P.56)	51
FIGURA 40 – GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS FAMÍLIAS DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS DIFERENTES EXTRATOS (ABUNDÂNCIA EM RELAÇÃO AO TOTAL DE COMPOSTOS IDENTIFICADO EM CADA AMOSTRA)	52
FIGURA 41 – GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS ABUNDÂNCIAS DAS SUBCLASSES DE ÁCIDOS GORDOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE ÁCIDOS GORDOS IDENTIFICADOS, PARA A AMOSTRA NE.....	54
FIGURA 42 – GRÁFICO CORRESPONDENTE AO TEOR TOTAL (%) DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DE HEXANO NE E E	58
FIGURA 43 – GRÁFICO DE E VERSUS E-H. REPRESENTAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DAS FAMÍLIAS DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS	59
FIGURA 44 – ESPETRO DE RMN DE 1H DO COMPOSTO A.....	63
FIGURA 45 – AMPLIAÇÃO DO ESPETRO DE HSQC DO COMPOSTO A.....	63
FIGURA 46 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA OBSERVADAS NO ESPETRO DE HMBC DO COMPOSTO A	64
FIGURA 47 – ESTRUTURA MOLECULAR DO COMPOSTO A.....	65
FIGURA 48 – ESPETRO DE RMN DE 1H DO COMPOSTO B	67
FIGURA 49 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA OBSERVADAS NO ESPETRO DE HMBC DO COMPOSTO B.....	68
FIGURA 50 – MISTURA DE COMPOSTOS B: B1 – (E)-FERULATO DE OCTADECANIL E B2 – (E)-FERULATO DE EICOSANIL.....	68
FIGURA 51 – AMPLIAÇÃO DO ESPETRO DE RMN DE 1H REFERENTE AO COMPOSTO C	71
FIGURA 52 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA OBSERVADAS NO ESPETRO DE HMBC.....	71
FIGURA 53 – FORMAS ESTRUTURAIS POSSÍVEIS PARA O COMPOSTO C.....	72
FIGURA 54 – ESTRUTURA DO COMPOSTO D.....	73
FIGURA 55 – CONETIVIDADES OBSERVADASNO ESPETRO DE HMBC DO COMPOSTO D	75
FIGURA 56 – A) AMPLIAÇÃO DO ESPETRO DE HSQC DO COMPOSTO D E B) CONFIGURAÇÃO DO GLICEROL NO COMPOSTO D	75
FIGURA 57 - HIDRÓLISE DE UM TRIGLICÉRIDO	75
FIGURA 58 – ESTRUTURA DO TRIGLICÉRIDO ISOLADO.....	76
FIGURA 59 – ESTRUTURA DO COMPOSTO E	77
FIGURA 60 – ESPETRO DE RMN DE 1H DO COMPOSTO E.....	78
FIGURA 61 – ESPETRO DE HSQC REFERENTE AO COMPOSTO E	79
FIGURA 62 – CONETIVIDADES OBSERVADAS NO ESPETRO DE HMBC DO COMPOSTO E.....	79
FIGURA 63 - ESPETRO DE MASSA DO COMPOSTO E	80
FIGURA 64 – MILNAMIDEO D, PÉPTIDO ANTIMITÓTICO QUE CONTÉM UMA UNIDADE DE TLE (DOMÍNIO A AZUL NA MOLÉCULA) ^[164]	81

FIGURA 65 – GINKGOLÍDEO B, UM POTENTE ANTAGONISTA <i>IN VITRO</i> DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA ^[167] ...	81
FIGURA 66 – ESPETRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO F	82
FIGURA 67 – ESPETRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO F	83
FIGURA 68 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA CORRESPONDENTES AO 1º DOMÍNIO ELUCIDADO DA MOLÉCULA F	84
FIGURA 69 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NOS ESPETROS DE COSY (SETAS AZUIS) E NOESY (SETAS VERMELHAS) DO COMPOSTO F	84
FIGURA 70 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA OBSERVADAS PARA O 2º DOMÍNIO ELUCIDADO DO COMPOSTO F	85
FIGURA 71 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA OBSERVADAS PARA O 3º DOMÍNIO ELUCIDADO DO COMPOSTO F	86
FIGURA 72 – FRAGMENTOS TERMINAIS DO COMPOSTO F E RESPECTIVAS CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA	86
FIGURA 73 – PROPOSTA DE ESTRUTURA DO COMPOSTO F	87
FIGURA 74 – FRAGMENTOS OBSERVADOS NOS VÁRIOS ESPETROS DE MASSA OBTIDOS PARA O COMPOSTO F	88
FIGURA 75 – ESQUEMA REFERENTE À METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. RAMOSISSIMA</i>	92
FIGURA 76 – ESQUEMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE HEXANO NE E E	93
FIGURA 77 – ESQUEMA DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE POR GC-MS DOS EXTRATOS DE HEXANO NE E E	93
FIGURA 78 – ESQUEMA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE DICLOROMETANO	96

1. Introdução

Os recursos naturais, nomeadamente, plantas, animais e minerais, são utilizados desde a antiguidade pelo ser humano, principalmente como fonte de alimentos e no tratamento de diversas doenças. Mundialmente as plantas estão na base do sistema de medicina tradicional^[1,2] e são a maior fonte de medicamentos e de compostos líderes para produção de fármacos.^[2,3] Atualmente, a demanda por medicamentos fitoterápicos continua^[1] e, conseqüentemente, mais plantas são alvo de novos estudos fitoquímicos, com o objetivo de se conhecer os seus constituintes químicos e, principalmente, descobrir novas moléculas biologicamente ativas.^[4]

É neste contexto que se enquadra o estudo da planta *Salicornia ramosissima* J. Woods (*S. ramosissima*), uma espécie do género *Salicornia* L.,^[5,6] que engloba diversas espécies com importantes aplicações na medicina tradicional, tais como tratamento de hipertensão, cefaleias e escorbuto,^[7] diabetes, obesidade, cancro,^[8,9] entre outras.

1.1. Caracterização da espécie e género

S. ramosissima (figuras 1a, 2 e 3a) é uma halófita (plantas adaptadas a ambientes salinos^[5]), pertencente à família Chenopodiaceae, uma das famílias mais evoluídas, das onze abrangidas pela ordem Caryophyllales.^[10]

Esta é uma planta anual, sem folhas aparentes, ereta, podendo atingir os 40 cm. Os seus caules são carnudos, simples e/ou extremamente ramificados, segmentados por articulações. Nas articulações encontram-se as folhas vestigiais (figura 3a). Tem inflorescências (figura 3b) espiciformes terminais, onde o artículo inferior é estéril e os restantes artículos férteis, compostos por dois conjuntos opostos de três flores cada. Estas flores dão sementes dimórficas, de tamanho diferenciado, que germinam em condições ambientais distintas.^[5,11-14]

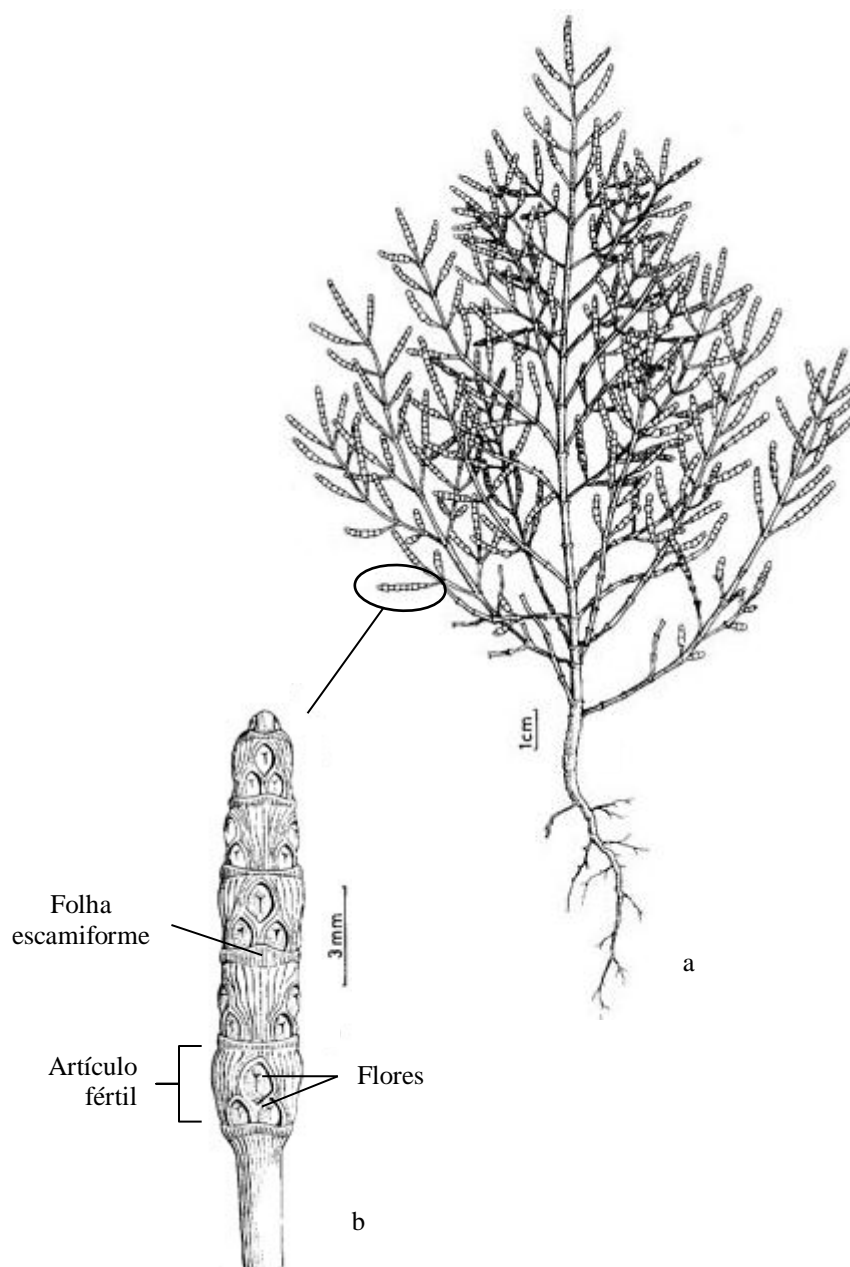


Figura 1 – *S. ramosissima*: a) hábito e b) inflorescência (adaptado de Castroviejo *et al.*^[11])

Muitas espécies do género *Salicornia* são verdes mas a sua ramagem torna-se vermelha no outono. Este facto é notável na *S. ramosissima*, tornando-se, por vezes, até vermelho-púrpura. A figura 2a e 2b ilustra a respetiva coloração na primavera e no outono. O seu nome comum em Inglaterra, “purple glasswort”, pode ter tido origem nesta coloração característica.^[5] Em Portugal e Espanha é conhecida vulgarmente como erva-salada.^[11]



Figura 2 – *S. ramosissima*: a) na primavera e b) no outono (Fotografada por José M. G. Pereira)

Salicornia é um dos grupos de plantas vasculares taxonomicamente mais complicado.^[6,15,16] A elevada plasticidade fenotípica é responsável pela complexidade dentro do género e as características morfológicas, como por exemplo a ausência de folhas aparentes, são responsáveis pelas dificuldades taxonómicas. Em certas espécies, a distinção é tão complicada, que são frequentes as descrições de agregados de espécies, subespécies e micro espécies.^[5,15] Por exemplo *S. ramosissima* (figura 3 a) e *S. europa* (figura 3 b) são, por vezes, classificadas como micro espécies, incluídas no agregado de espécies *S. europaea* agg.,^[17] devido à extrema dificuldade que existe em diferenciá-las. A diferença morfológica entre ambas limita-se a uma diferença de décimos de milímetro na largura da borda superior, do segmento do caule.^[18] Contudo, estas duas espécies são de facto distintas geneticamente^[13] e a ausência de híbridos naturais confirma que mantêm o isolamento reprodutivo.^[18] Estas duas espécies desenvolvem-se no mesmo habitat, no entanto, observam-se distribuições preferenciais, *S. ramosissima* é encontrada no limite superior da maré e *S. europaea* no limite inferior.^[18]

Uma vez que *S. ramosissima* cresce no limite superior da maré, passa longos períodos do seu desenvolvimento fora de água, sofrendo uma elevada exposição aos raios UV. Um estudo recente revela que esta espécie exibe uma resposta fotoprotetora aos raios UV, relacionada com o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da mesma.^[19]



Figura 3 – a) *S. ramosissima* J. Woods^[20] e b) *S. europaea* L.^[21]

O género *Salicornia* desenvolve-se em vários climas, desde temperados a tropicais.^[22] Estas plantas encontram-se entre as mais tolerantes a ambientes salinos e, por este motivo, ocupam as zonas mais salgadas,^[13] estando dispersas por todos os continentes com exceção da Antártica.^[16,23] No seu habitat desempenham funções de proteção contra a erosão provocada pela força das ondas, na costa, e de filtração de contaminantes do sedimento, cruciais para a ecologia da zona.^[24,25] Por exemplo, *S. europaea* remove cádmio de solos salinos^[26], *S. bigelovii* remove efetivamente selénio de solos e águas contaminadas,^[27] e ambas têm a capacidade de inibir o crescimento de *Skeletonema costatum*, uma diatomácea marinha responsável pela eutrofização das águas.^[28,29]

S. ramosissima desenvolve-se preferencialmente no litoral costeiro, em pântanos e sapais salgados ou salinas temporariamente alagadas. Amplamente distribuída na parte oeste da Europa,^[18] no Mediterrâneo e noroeste de África, pode ser encontrada em todo o litoral da Península Ibérica, sendo frequente no sapal da ria de Aveiro, e menos frequentemente no Minho.^[11,12,14] Ocupa, preferencialmente, locais não ocupados por outras halófitas.^[13]

O crescimento da *S. ramosissima* é influenciado pela salinidade do meio. Um estudo realizado por Silva *et al.*^[14] comprova que esta halófita apresenta um crescimento ótimo a salinidades baixas ou moderadas, em vez de salinidades elevadas, pelo que é considerada uma halófita não obrigatória.

S. ramosissima é uma pioneira, sendo frequentemente a primeira planta superior a colonizar as zonas da maré.^[5] Assim, é de crucial importância incluí-la em estratégias de preservação e conservação destes ecossistemas, como é o caso da Ria de Aveiro, sistema lagunar de grande importância económica para a indústria, agricultura, pesca e turismo.^[13]

1.2. Propriedades nutricionais do género *Salicornia*

Espécies do género *Salicornia* estão incluídas na alimentação humana, desde a antiguidade. As primeiras pessoas do interior da América (povos índios) ferviam a *S. rubra* (*S. europaea* subsp. *rubra*) (figura 4a) em água e deixavam evaporar a solução para obter sal. A tribo nativa americana Gosiute desfazia as sementes em pó para fazer pão doce. Os habitantes da costa noroeste do Pacífico comem os caules suculentos de *S. perennis* (figura 4b), pelo menos desde 1880.^[30]

Os caules jovens de *S. herbacea* (figura 4c), denominada de “hamcho” e “tungtungmadi” na Coreia, são consumidos como salada ou vegetal, com diversos temperos, nas zonas costeiras da Coreia.^[9,24,31] Por toda a Europa, esta espécie é o ingrediente principal em saladas e, mais concretamente, na Inglaterra, onde é vulgarmente conhecida como “samphire” ou “saltwort”, é consumida como vegetal cozido.^[32]

Mudie *et al.*^[30] descreveram a utilização da “glasswort” ou “saltwort” (*S. europaea* e *S. bigelovii*, ilustradas na figura 4d e 4e, respetivamente) fresca, em saladas, ou engarrafada como pickles, na Nova Escócia, Canadá. As suas partes aéreas são adicionadas ao vinagre, em Itália e França.^[31]

Atualmente, a planta *S. europaea* subsp. *europaea* é sazonalmente comum em mercados da Ânglia Oriental, Inglaterra, onde é conhecida como “samphire”, “pickleweed” ou “glasswort”.^[33]

Um trabalho anterior de Pojar e Mackinnom^[34] descreve os caules jovens da espécie ilustrada na figura 4f, *S. pacifica*, como um vegetal verde selvagem que, por vezes, é comercializado em restaurantes “gourmet”.

Espécies do género *Salicornia* também são consumidas por animais. Na Coreia, toda a *S. herbacea* é avidamente devorada pelo gado devido ao seu sabor salgado.^[35] Há evidências de tegumentos das sementes de *Salicornia* em fezes de coelho (*Oryctolagus cuniculus*); o rato do campo de dorso amarelo (*Apodemus flavicollis*) consumiu preferencialmente sementes deste género armazenadas, em relação a batatas, cenouras e maçãs.^[5] Contudo, pode não ser um alimento desejável para algumas aves. Por exemplo, *S. europaea*, do sapal de Nova Inglaterra, USA, é relativamente intragável para o ganso-do-canadá (*Branta canadensis*). Na *S. europaea* há um aumento da percentagem dos compostos fenólicos, nos meses que decorrem entre Maio e Setembro, que se pensa estar

associado com o sabor intragável para o ganso-do-canadá.^[36] Do mesmo modo, também *S. bigelovii* possui um mecanismo de defesa química, o qual inclui um sabor picante contra espécies que a tentem comer.^[37]

Atualmente, a salinidade dos solos é uma importante questão na agricultura. Um dos maiores e mais urgentes problemas globais tem que ver com a necessidade de água e terrenos agrícolas que satisfaçam as necessidades alimentares mundiais.^[38,39] *Salicornia* foi reconhecida como uma das mais promissoras culturas que pode ser interposta na produção de alimentos para humanos e animais.^[39,40] Isto pode estar associado ao facto das halófitas serem capazes de produzir uma quantidade relativamente alta de biomassa em áreas salinas;^[38] e, por outro lado, tal como foi mencionado anteriormente, muitas espécies do género poderem ser utilizadas como alimentos alternativos.^[41]

S. bigelovii tem sido cultivada para produção de sementes oleaginosas e folhagem, em ambientes áridos, uma vez que pode ser irrigada com água do mar ou outras águas salinas,^[42-44] pelo que o seu cultivo é sustentável.^[43,45] Estudos^[22,42] demonstram que, apesar do seu elevado teor de sal, animais alimentados com níveis moderados de *Salicornia* ganham tanto peso como aqueles cuja dieta incluía feno ou outras plantas terrestres. A biomassa de *S. bigelovii* pode ser utilizada como um substituto não convencional em dietas de cabras^[46] e frangos.^[47] Também a espécie *S. brachiata* (figura 4g) é considerada potencial alternativa para cultura com água salina. A presença de proteínas ricas em enxofre, altamente nutritivas e a presença de ligações dissulfeto inter- e intramoleculares tornam esta espécie um potencial suplemento alimentar.^[48] O perfil em oligossacáridos de *S. brachiata*, determinado por Mishra *et al.*,^[49] reforça a possibilidade de emprego desta espécie como suplemento alimentar.

Contudo, devem ser tidos em conta outros fatores, como a influência de poluentes e acumulação de metais, nas espécies de *Salicornia*, quando se pensa em usá-la como alimento. Por exemplo, as plantas da espécie *S. virginica*, ilustradas na figura 4h, são muito sensíveis à presença de poluentes, tais como o cádmio e derivados de petróleo de baixo peso molecular, que tendem a acumular-se nas raízes.^[50] Um estudo recente mostrou que as raízes de *S. europaea* acumulam muito mais metais pesados que os órgãos superficiais.^[51]

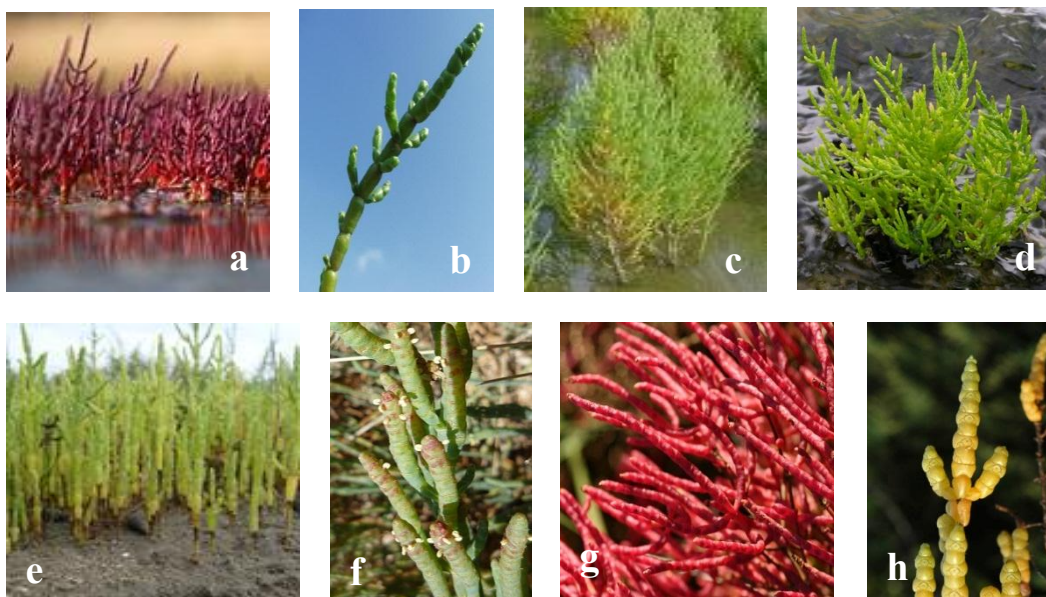


Figura 4 – Exemplos de plantas do género *Salicornia* L.: a) *S. rubra*,^[52] b) *S. perennis*,^[53] c) *S. herbacea*,^[54] d) *S. europaea*,^[55] e) *S. bigelovii*,^[56] f) *S. pacifica*,^[57] g) *S. brachiata*^[58] e h) *S. virginica*^[59]

Algumas espécies foram sujeitas a avaliações do seu potencial nutricional. Por exemplo, análises nutricionais mostraram que *S. bigelovii* contém elevadas quantidades de vitaminas (A e C), minerais (principalmente magnésio, ferro e cálcio) e aminoácidos essenciais, que a tornam um suplemento nutricional e dietético ideal. Os seus níveis proteicos são menores que na folha do aipo (2,6%) e do espinafre (2,6%), mas semelhantes aos da alface (1,3%) e do repolho Chinês (1,4%).^[40]

O teor de lípidos também tem sido foco de alguma atenção devido ao seu efeito na saúde. O perfil lipídico de *S. bigelovii* é relativamente baixo e caracteriza-se por um elevado grau de ácidos gordos insaturados, principalmente ácidos α -linolénico e linoleico.^[40] As sementes desta planta possuem um elevado teor de gorduras polinsaturadas, com textura semelhante ao azeite e sabor similar a nozes, contudo, as sementes brutas apresentam saponinas que as tornam não comestíveis.^[30] Outras plantas do género também apresentam sementes com um elevado valor de saponificação, com é o caso da *S. brachiata*.^[60] Por outro lado, sementes de uma variedade híbrida *S. bigelovii* (SOS-10) apresentam uma percentagem de óleo de 27,2-32,0%, e o seu óleo contém um nível bastante elevado de ácido linoleico ($C_{18:2}$ (9Z, 12Z)) e menor de ácido oleico ($C_{18:1}$ (9Z)). O ácido linolénico ($C_{18:3}$ (9Z, 12Z, 15Z)) foi encontrado em baixas quantidades. Relativamente a ácidos gordos saturados, ocorrem em menor quantidade que os polinsaturados destacando-se os ácidos palmítico e esteárico. Muitos parâmetros do óleo das sementes de *S. bigelovii* são

comparáveis aos do óleo de cártamo.^[61] Austenfeld^[62] determinou um perfil lipídico semelhante em *S. europaea*. A análise do óleo das suas sementes indica que o conteúdo total de lípidos varia entre 26 e 30%, sendo o ácido linoleico o principal componente, aproximadamente 70% do conteúdo de ácidos gordos.^[62,63] O conteúdo total de lípidos e a distribuição de ácidos gordos em *S. europaea* demonstra as boas qualidades nutricionais desta planta.^[64] O óleo de sementes de *Salicornia* (SOS-7), uma variedade híbrida, selecionada para produção de sementes oleaginosas, também foi analisado.^[65,66] O seu perfil lipídico é dominado por ácidos insaturados.^[66]

Também foram atribuídos benefícios nutricionais a *S. herbacea*. Esta contém grandes quantidades de sal e outros minerais, especialmente magnésio, cálcio, ferro, potássio e iodeto, bem como fibras dietéticas.^[67-69] Adicionalmente, contém aminoácidos essenciais e uma grande quantidade do aminoácido betaína e da amina natural colina. Os efeitos benéficos do consumo de *S. herbacea* podem ter que ver com a absorção destes nutrientes. Está comprovado que a betaína reduz potencialmente o nível tóxico da homocisteína, um aminoácido encontrado normalmente no sangue e que em níveis elevados está implicado no aumento da probabilidade de desenvolver doenças cardíacas, AVC, doenças hepáticas e vasculares periféricas.^[68]

Atualmente, para além do crescente interesse na utilização de espécies do género *Salicornia* na alimentação animal e humana, a atenção volta-se para o seu aproveitamento farmacológico e medicinal.

1.3. Aplicações farmacológicas e tradicionais das espécies de *Salicornia*

O uso de *Salicornia* L. na medicina tradicional, tal como na alimentação, também está bem documentado. Na América do Norte, em 1793-1794, a espécie “samphire”, (*S. europaea*), natural das salinas do sudoeste do Alasca, era conhecida pelas suas propriedades antiescorbúticas.^[30] Recentemente, foi descrita a administração oral de *S. europaea* fresca, no Golfo de Edremit, Turquia, para o tratamento de papeira.^[70] A mesma espécie é utilizada na medicina tradicional Chinesa, no tratamento de hipertensão, cefaleias e escorbuto.^[7]

O aumento do número de pacientes com doenças do sistema imunitário, que sofrem de infeções fúngicas e parasitárias oportunistas, juntamente com um gradual aumento da resistência a antibióticos, aumenta dramaticamente a necessidade de fármacos que atuem contra microrganismos. O extrato etanólico de partes aéreas de *S. europaea* exibiu capacidade de inibir o crescimento de algas, bem como atividade moderada contra leveduras, no entanto não exibiu atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.^[71] O extrato etanólico demonstrou ainda atividade citotóxica significativa contra *Artemia salina* L. e *Daphnia magna* S., bem como um efeito inibidor na indução de tumores, portanto, esta espécie poderá ser candidata a estudos posteriores, no âmbito de encontrar e desenvolver novos compostos antitumorais.^[72]

S. brachiata é responsável por atividade antifúngica. O extrato de metanol/água mostrou-se significativamente eficiente contra a espécie *Aspergillus niger*, e moderadamente eficiente contra outras duas espécies de *Aspergillus*.^[73] Chandrasekaran *et al.*,^[74] reportaram que o extrato da mesma planta, constituído principalmente por ésteres metílicos de ácidos gordos, exhibe atividades antibacteriana e antifúngica elevadas, em comparação com extratos de outras Chenopodiaceae.^[74] Extratos obtidos a partir das raízes desta planta mostraram-se eficientes contra bactérias gram-positivas.^[75] Preparações de *S. brachiata* são utilizadas na Índia no tratamento de sarna e prurido.^[76] O extrato de metanol obtido a partir das partes aéreas de *S. brachiata* mostrou-se eficiente na captação dos radicais hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), DPPH, ABTS e anião superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). Este também demonstrou habilidade redutora, o que indica uma potencial atividade antioxidante da espécie *S. brachiata*.^[77]

Salicornia spp., colhidas no Irão, têm a capacidade de reduzir o crescimento de estirpes de *Staphylococcus aureus*^[78] e de *Escherichia coli*.^[79] As saponinas têm a capacidade de lisar as paredes celulares e, com base neste facto, os autores preveem que a inibição do crescimento esteja relacionada com a alteração da integridade da parede celular nas bactérias.^[79]

S. herbacea é amplamente utilizada na medicina tradicional em países orientais, no tratamento de doenças intestinais,^[67] diabetes, obesidade, cancro,^[8,9] indigestão, gastroenterites, nefropatias, hepatite,^[69] asma, artrites,^[35,67] hipertensão e hemorróidas.^[80,81] De facto, esta é a espécie de *Salicornia* mais bem documentada, sendo que existem muitos estudos sobre os seus efeitos farmacológicos e biológicos: exhibe atividade anti-inflamatória,^[9] antiproliferativa,^[24] anti-hiperglicémica,^[8,69,82] anti-hiperlipidémica,^[8,83] antibacteriana^[84] e antioxidante.^[9,31,81] De facto, podem encontrar-se patentes que reforçam este conhecimento. Por exemplo, patentes de preparação de extratos de *S. herbacea* para tratamento de leucemia mielóide e aumento da imunidade^[85] ou para prevenção do ganho de peso e hiperlipidemia.^[86]

O interesse biológico e clínico dos antioxidantes está relacionado com o seu papel protetor contra danos induzidos por stress oxidativo, que podem culminar em cancro, arteriosclerose ou envelhecimento precoce.^[23] O stress oxidativo causado por espécies reativas de oxigénio (ROS) conduz a danos oxidativos em células, tecidos e órgãos e também à peroxidação lipídica e desativação das enzimas antioxidantes endógenos (SOD, CAT, GSH).^[31,67]

O extrato aquoso de *S. herbacea* apresenta atividade antioxidante forte, que varia de acordo com a dose, no entanto, esta atividade é menor que a evidenciada pelo ácido ascórbico.^[67] O extrato de água e metanol de *S. herbacea*, tratados enzimaticamente, apresentam um excelente efeito na inibição da peroxidação lipídica em fígado de ratinho, com efeito dependente da dose. Esta inibição é mais eficiente no extrato aquoso tratado enzimaticamente sendo mais eficaz que o α -tocoferol, usado como referência.^[69]

Um estudo recente e bastante completo, sobre atividade antioxidante, demonstra que o extrato de etanol de sementes de *S. herbacea* e suas frações, apresentam forte atividade anti-radicalar. Destacaram-se a fração de acetato de etilo, a qual apresentou a atividade mais eficaz na captação dos radicais DPPH, ABTS e NO; e a fração de éter etílico, com os melhores resultados de inibição da peroxidação lipídica. No mesmo estudo,

também foi demonstrado que o extrato de etanol e suas frações, exercem um efeito citotóxico contra o crescimento de células tumorais das linhas HCT 116 (linha celular com taxa de crescimento rápido) e HT29 (crescimento moderado), do cólon humano. A fração de éter é responsável pelo efeito citotóxico mais potente e também por uma toxicidade significativamente menor contra as células intestinais normais (INT-407). Esta toxicidade seletiva não acontece com as restantes frações.^[81] O extrato de metanol, obtido a partir dos caules da planta *S. herbacea*, demonstrou um potente efeito antioxidante, na medida em que captou efetivamente o radical DPPH e exibiu capacidade de inibir a peroxidação lipídica. No entanto, o IC₅₀ deste extrato é maior que o IC₅₀ do BHT, um antioxidante sintético, utilizado como referência.^[84]

Recentemente, Yu *et al.*,^[87] (2012) demonstraram a atividade antioxidante e bacteriostática de alguns extratos de *S. herbacea* e, com base nisso, sugeriram sua aplicação como aditivo alimentar e ingrediente de fármacos.^[87] Foram realizados vários estudos, *in vivo*, para avaliar os mecanismos antioxidantes desta halófita. Um exemplo é o trabalho levado a cabo por Ha *et al.*,^[67] onde é administrado o extrato aquoso de *S. herbacea* a ratinhos. O tratamento leva ao aumento das atividades das enzimas destoxificantes, por captação de radicais e consequentemente, a diminuição favorável dos níveis de MDA (um produto resultante da peroxidação lipídica). Assim, o extrato aquoso atua como modulador dos antioxidantes endógenos, ajudando na restauração do equilíbrio celular oxidativo e consequentemente, minimizar o dano celular causado pelos ROS.^[67]

O extrato metanólico de *S. herbacea* demonstrou atividade antimicrobiana contra vários organismos patogénicos. A resistência das estirpes bacterianas é variável, mas verificou-se que as gram-positivas são mais suscetíveis que as gram-negativas. A presença de fenóis e polissacarídeos no extrato metanólico encontra-se associada à atividade antimicrobiana observada.^[84]

Os polissacarídeos isolados a partir do extrato aquoso obtido a quente de *S. herbacea*, estão também associados ao efeito imunomodulatório observado nesta espécie.^[88] *S. herbacea*, administrada a ratinhos, apresentou um efeito modulatório do sistema imunitário, caracterizado pelo aumento da capacidade fagocitária, e consequente ativação de macrófagos.^[35,68] A ativação de macrófagos ocorreu de duas formas distintas: i) indução de produção de citocinas (TNF- α e IL-1 β), que estão normalmente implicados como mediadores chave da resposta produzida por macrófagos, em infeções ou

inflamações bacterianas; ii) libertação de NO (relacionado com a função citotóxica dos macrófagos contra uma variedade de tumores).^[35,68] Em simultâneo com o aumento destes parâmetros de ativação, *S. herbacea* induz alterações morfológicas em monócitos pouco aderentes que se diferenciam em macrófagos fortemente aderentes.^[68] Posteriormente, Im *et al.*,^[88] verificaram que os polissacarídeos de *S. herbacea* combinados com interferão- γ (IFN- γ) possuem um efeito inibitório sinérgico de linhas celulares de monócitos de ratinhos, RAW 264.7, induzindo adicionalmente a diferenciação em macrófagos. O efeito sinérgico dos polissacarídeos e IFN- γ também se verificou responsável pela produção de TNF- α , IL-1 β e NO. A atividade sinérgica foi mais proeminente quando a concentração de polissacarídeos era baixa. Estes resultados confirmam que *S. herbacea* contém polissacarídeos imunomodulatórios.^[88]

Jo *et al.*,^[89] realizaram um estudo, em ratinhos, onde o tratamento com *S. herbacea* (10% e 20% de pó da planta) conduziu a um decréscimo no ganho de peso, acompanhado de diminuição significativa dos níveis de LDL e do conteúdo total de lípidos e triglicéridos, no soro, relativamente a um grupo de controlo. Por outro lado, verificou-se um aumento de HDL no soro.^[89] Estes resultados sugerem que a *S. herbacea* tem uma ação anti-hiperlipidémica.

Park *et al.*,^[90] demonstraram que o extrato etanólico de *S. herbacea* tem capacidade de inibir tanto o ganho de peso, como a hiperglicemia. Este extrato apresenta capacidade modulatória da expressão de genes relacionados com a lipogénese (os possíveis mecanismos hipoglicémicos e hiperglicémicos propostos estão ilustrados na figura 5).^[90] Estudos posteriores demonstram também a influência no nível de colesterol sanguíneo. Foi reportada uma redução significativa dos níveis de colesterol total, de triglicéridos e colesterol-LDL e um aumento dos níveis de colesterol-HDL. Por outro lado, foi observada uma redução substancial da acumulação de gorduras no citoplasma e adicionalmente, houve recuperação dos tecidos hepáticos, no grupo de controlo.^[83] Estes resultados sugerem que os extratos desta planta representam um excelente candidato para proteção dos hepatócitos danificados por uma dieta rica em gorduras, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de hiperglicemia e hiperlipidemia, sem ganho de peso simultâneo.^[83,90]

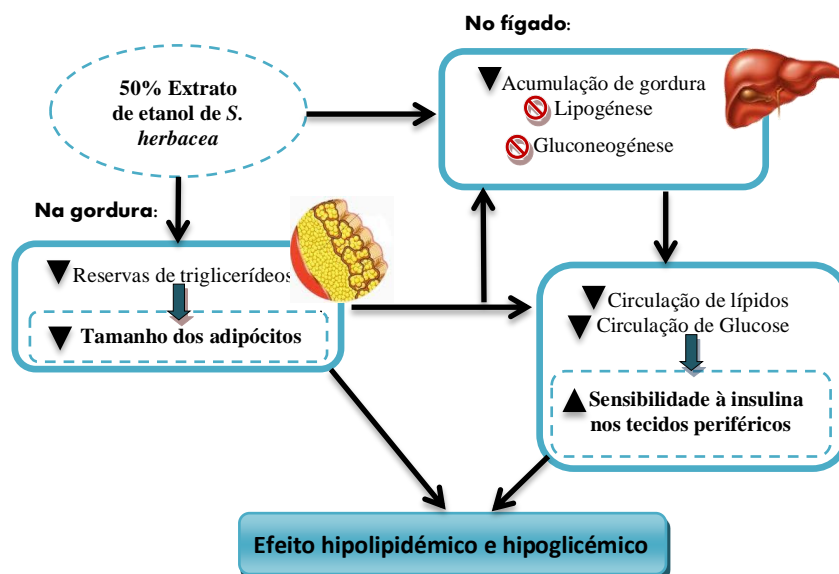


Figura 5 – Possíveis mecanismos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos do extrato de etanol de *S. herbacea* (adaptado de Park *et al.*, 2006)^[90]

A diabetes tipo 2 é uma condição caracterizada por elevadas concentrações de glucose no sangue e está associada a diversas complicações secundárias graves, tais como obesidade, enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral, entre outros. Os fármacos disponíveis para o tratamento da diabetes tipo 2 têm várias limitações associadas a efeitos colaterais e promovem o ganho de peso enquanto diminuem a glucose sanguínea. Um fármaco com a combinação de propriedades descritas anteriormente para o extrato de *S. herbacea* é a melhor opção para 90% dos pacientes com diabetes do tipo 2, que tenham problemas de peso associados à diabetes.^[90] Um estudo posterior descreveu que o extrato de etanol da planta em questão exerce uma atividade inibitória contra a lipase pancreática suína, facto que pode explicar a eficiência da planta no controlo da hiperlipidemia.^[91]

Para além do extrato etanólico, também o extrato aquoso de *S. herbacea* se revelou interessante. O extrato aquoso de *S. herbacea* tem a capacidade de inibir a tirosinase, o que resulta na inibição da síntese de melanina. Assim, funciona como agente branqueador da pele, que poderá ser uma promissora base para cosméticos, no tratamento de manchas da pele. Recentemente foi desenvolvido o extrato aquoso de *S. herbacea*, para emprego em diversos cosméticos e regimes alimentares saudáveis, que permitam o rejuvenescimento da pele.^[92] Efetivamente, já é possível encontrar no mercado produtos anti-envelhecimento que contêm na sua composição extratos de espécies do género *Salicornia*, como é o caso dos cosméticos ilustrados na figura 6.^[93,94]



Figura 6 – Cosméticos anti-envelhecimento que contêm *S. herbacea* na sua composição^[93,94]

Recentemente, foi realizado um estudo sobre as potencialidades terapêuticas de *S. ramosissima* em ratinhos. No entanto, as conclusões obtidas não estão de acordo com o que se verifica para as espécies descritas anteriormente. No caso de *S. ramosissima*, a administração do extrato de etanol a um grupo de ratinhos conduz a uma condição de hepatotoxicidade e inflamação nos nefrônios. A administração de sementes causa inflamação significativa dos rins e pequenas alterações hepáticas. Por outro lado, a administração de sementes e do extrato etanólico mostra-se ineficiente tanto na proteção como na regeneração de lesões no fígado e rins de ratinhos, provocadas pelo tratamento com o tóxico CCl₄. Antes pelo contrário, observou-se um efeito nocivo, que culminou em morte, possivelmente por enfraquecimento das funções normais. Estas evidências levam a que se levantem uma serie de questões acerca desta espécie e os seus mecanismos de ação que continuam por esclarecer e à necessidade de novos estudos acerca desta planta.^[95]

1.4. Estudos fitoquímicos em espécies de *Salicornia*: compostos isolados

As atividades biológicas descritas anteriormente despertaram o interesse para composição fitoquímica das espécies de *Salicornia*. O principal objetivo é o isolamento e caracterização dos metabolitos secundários destas plantas.

De um modo geral, a família Chenopodiaceae engloba espécies com óleos essenciais, alcaloides, triterpenos e flavonoides.^[10] Plantas do género *Salicornia* L. apresentam um pigmento betacianino, um derivado da betanidina ligado a uma unidade de dissacarídeo (**1**) (figura 7), descrito por Davy *et al.*,^[5] e posteriormente por Liebezeit.^[4] Ambos os autores defendem que este pigmento explica a coloração vermelho-violeta típica destas plantas, no outono.

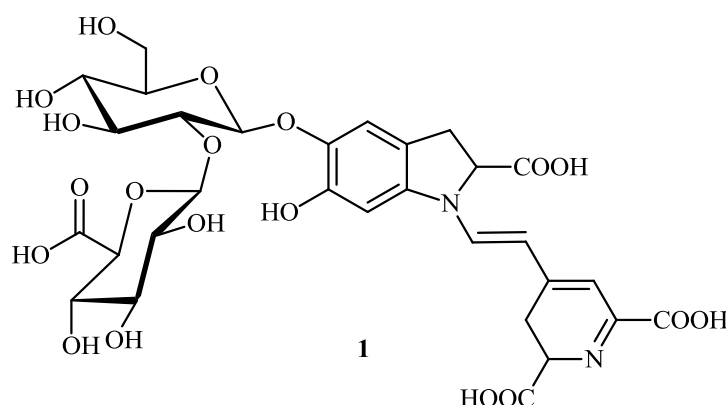


Figura 7 – Pigmento responsável pela coloração avermelhada

Existem alguns estudos sobre a caracterização de compostos isolados a partir de espécies de *Salicornia*, no entanto, *S. ramosissima* é uma das espécies menos estudadas. Renard *et al.*,^[96] examinaram as paredes celulares de tecidos de *S. ramosissima* e identificaram os ácidos ferúlico (**2**) e acético (**3**), monossacarídeos, como a glucose (**4**) e o ácido galacturónico (**5**) (figura 8), e proteínas.

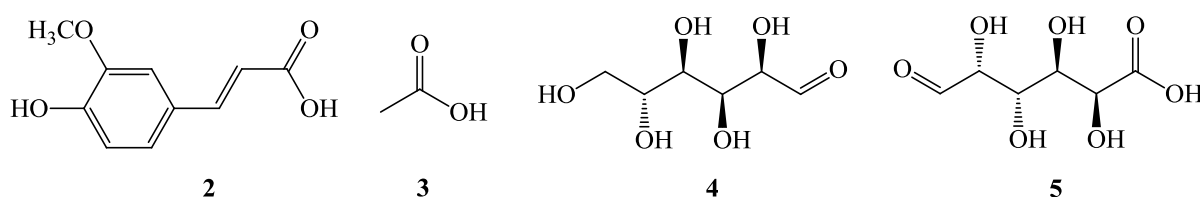


Figura 8 – Metabolitos secundários isolados a partir da *S. ramosissima*

Por outro lado, o primeiro estudo fitoquímico em espécies de *Salicornia* remonta a 1965 e reporta o isolamento de derivados alcaloides da *S. herbacea*, entre eles a saliherbina ($[\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}]^+\text{Cl}^-$) e a salicomina, por vezes identificada como salicornina, ($[\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4]^+\text{Cl}^-$).^[97] Aparentemente, não foram feitas tentativas de determinar a estrutura destes compostos. Chiji *et al.*,^[98] levaram a cabo o estudo dos caules da *S. europaea*, onde isolaram duas cromonas, a 6,7-dimetoxicromona (**6**) e a 6,7-metilenodioxicromona (**7**) (figura 9).^[98] Posteriormente foram isoladas, a partir de extratos de metanol, da mesma espécie, mais duas cromonas, a 7-hidroxi-6-metoxicromona (**8**) e a 7-(β -D-glucopiranosiloxi)-6-metoxicromona (**9**) (figura 9),^[99] e vários derivados de cromonas pertencentes à família dos flavonoides, tais como 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxi-isoflavona (**10**), a 2',7-di-hidroxi-6-metoxi-isoflavona (**11**) e a (-)-(2S)-2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavanona (**12**) (figura 10).^[100] No caso do último composto, os autores obtiveram a rotação específica da molécula e determinaram a configuração absoluta do centro estereogénico. Outros derivados de flavonoides isolados e caracterizados, a partir do extrato etanólico de toda a *S. europaea*, incluem a quercetina (**13**), a isoquercitrina (**14**), a rutina (**15**), a 4'-(β -D-glucopiranosiloxi)-isoramnetina (**16**); a 3-(6''-malonil)-(β -D-glucopiranosiloxi)quercetina (**17**) (figura 10).^[101] Os flavonóides representam 1,2% do peso seco da *S. europaea*, onde o último composto (**17**) é o mais abundante.^[101] De facto, crê-se que este derivado da quercetina seja um composto importante, produzido pelas plantas, como mecanismo de defesa contra os danos induzidos pela luz UV.^[4]

Recentemente, também as raízes da *S. europaea* foram alvo de estudos fitoquímicos e a partir do extrato metanólico foram identificados a isoquercitrina (**14**) e a rutina (**15**) (figura 10).^[29]

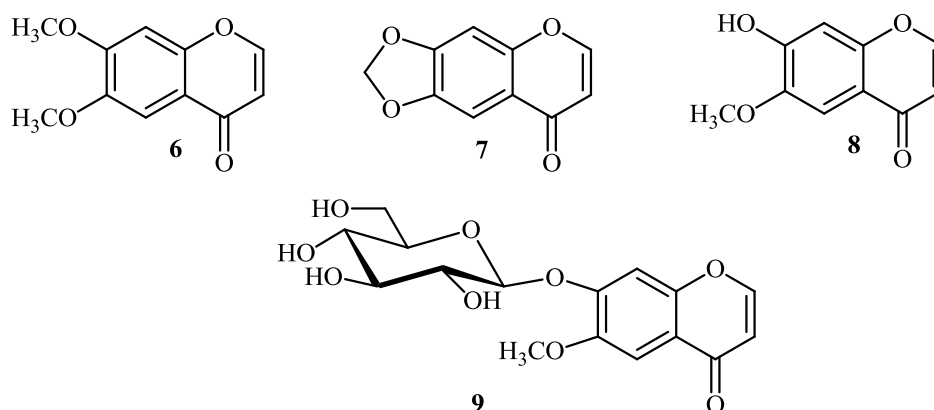


Figura 9 – Cromonas isoladas a partir de *S. europaea*

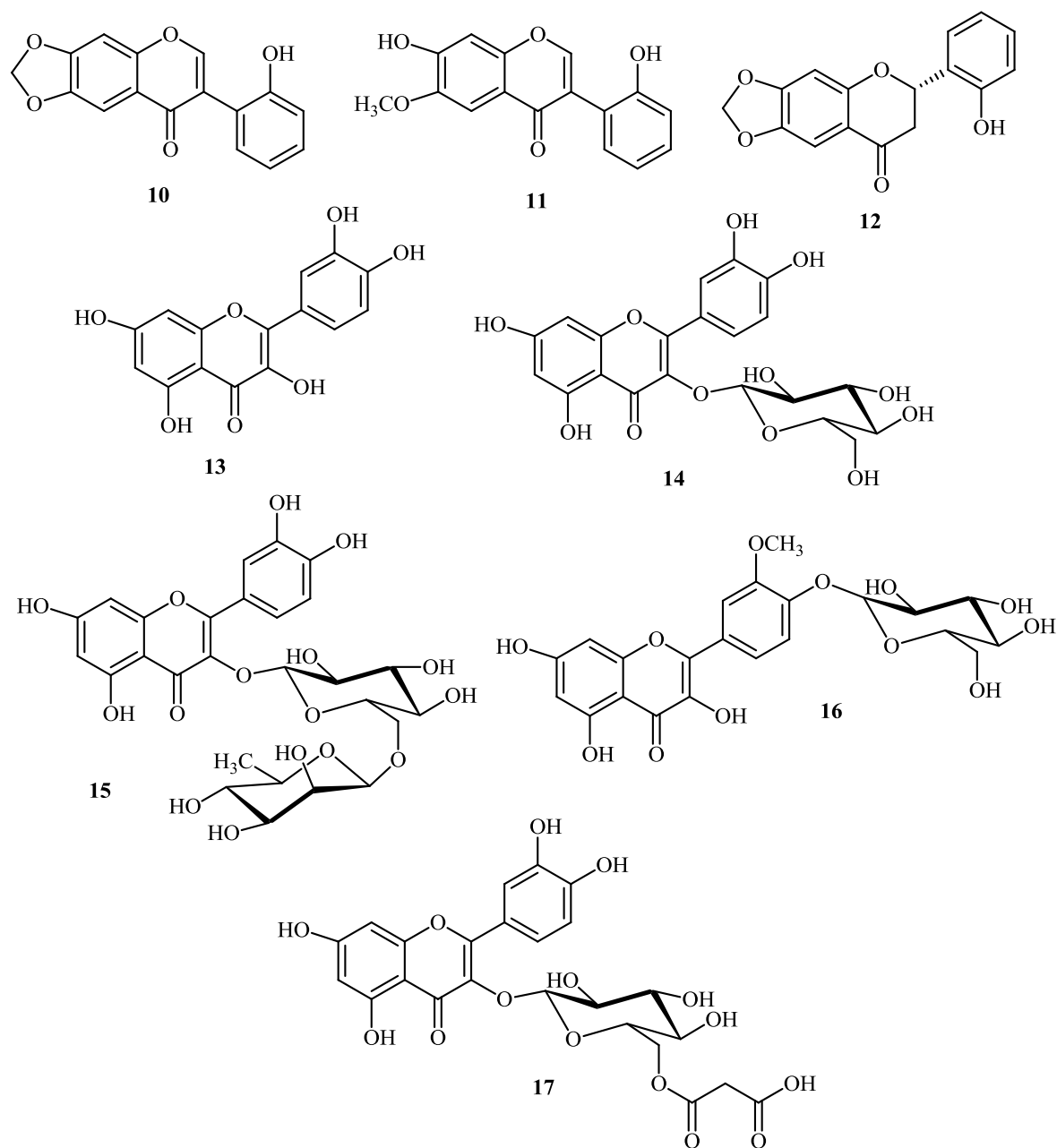


Figura 10 – Derivados de flavonoides isoladas a partir de *S. europaea*

A partir do extrato etanólico da *S. europaea* L. foram isoladas as seguintes saponinas triterpênicas: éster 3 β ,29-di-hidroiolean-12-en-28-ato de β -D-glucopiranosilo (**18**), éster oleanato de β -D-glucopiranosilo (**19**), éster metílico da chikusetsusaponina IVa (**20**), da calendulósido E (**21**) e do 6'-metilo-calendulósido E (**22**) (figura 11).^[102]

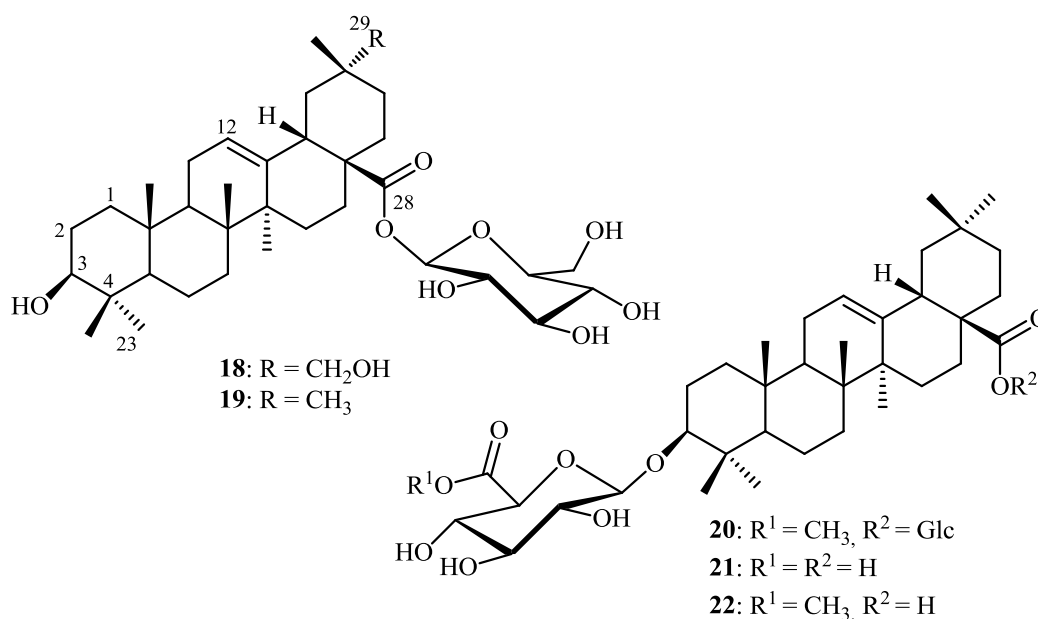


Figura 11 – Saponinas triterpénicas isoladas a partir de *S. europaea*

Relativamente ao perfil lipídico da *S. europaea*, Tikhomirova *et al.*,^[103] isolaram 24 ácidos gordos, a partir de partes aéreas da mesma. No entanto, o teor de lípidos é relativamente baixo (7% do peso seco) e apenas os ácidos palmítico (**23**), oleico (**24**), linoleico (**25**) α -linolénico (**26**) (figura 12) estão presentes em quantidades significativas, onde o ácido α -linolénico (**26**) é o mais abundante.^[103] As sementes de *S. europaea* são ricas em lípidos, destacando-se o ácido linoleico (**24**), constituindo 70% do conteúdo total de ácidos gordos.^[62,63]

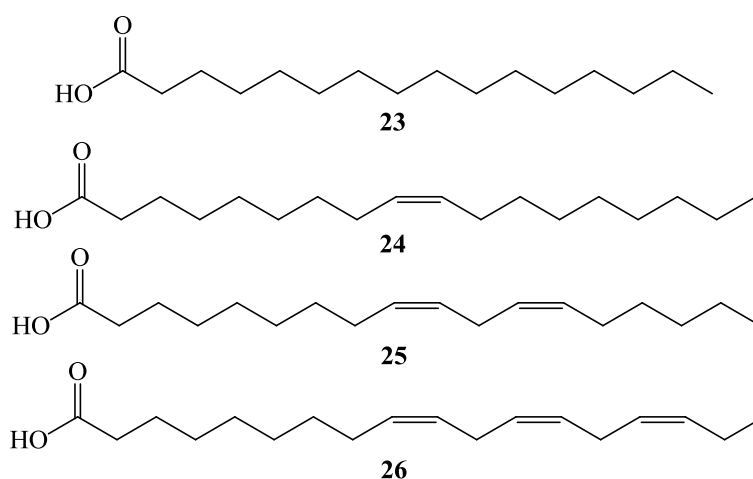


Figura 12 – Exemplos de ácidos gordos isolados a partir *S. europaea*

Os tecidos fotossintéticos das espécies de *Salicornia*, apresentam uma capacidade notável de sintetizar diversos esteróis. A partir de extratos de *S. europaea* foram identificados oito etil-esteróis, onde o espinasterol (**27**) e o estigmasterol (**28**), ilustrados na figura 12, são os mais abundantes.^[104] Os mesmos autores^[104] também estudaram os derivados esteroides nos extratos de *S. bigelovii* e descobriram que estas duas espécies são muito semelhantes, na medida em que a única diferença significativa se resume à ausência de isofucosterol (**29**) (figura 13), na *S. europaea*.

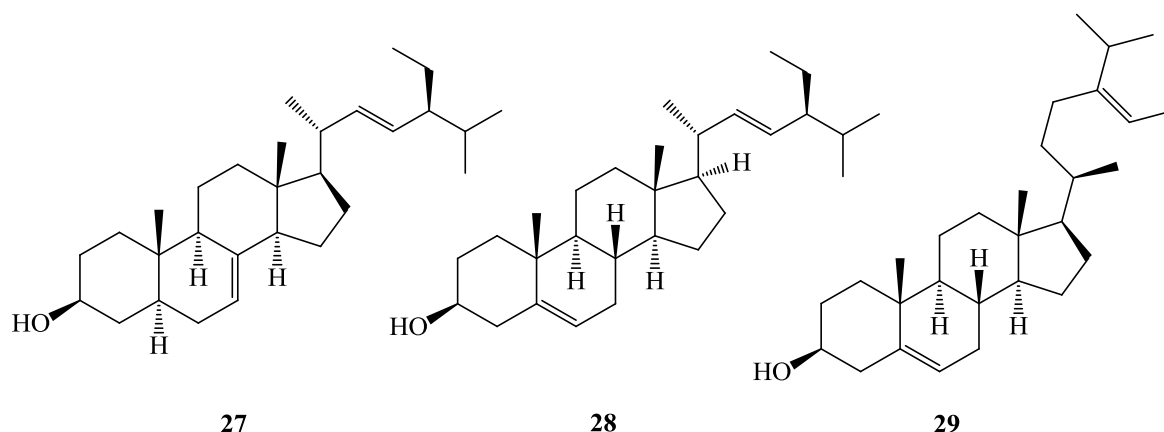


Figura 13 – Exemplos de derivados de esteróis isolados a partir de *S. europaea* e/ou *S. bigelovii*

O estudo da fração do n-butanol do extrato de etanol da *S. bigelovii* permitiu o isolamento de duas novas saponinas raras, a bigelovii A (**30**) e a bigelovii B (**31**) (figura 14).^[7] Os autores também isolaram duas saponinas nortriterpênicas: o ester 3-(β -D-glucopiranosiloxi)-30-norolean-12,20-dien-28-oato de β -D-glucopiranosilo (também conhecido como pfaffine B) (**32**) e o 3- β -hidroxi-30-norolean-12,20-dien-28-oato de β -D-glucopiranosilo (também conhecido como boussingosido A₂) (**33**), e três glicosídeos triterpênicos do tipo oleanano, o éster oleanolato de β -D-glucopiranosilo (**19**) (figura 11), o ácido 3-(β -D-glucopiranosiloxi)oleanólico (**34**) e o éster 3-(β -D-glucopiranosiloxi) oleanolato de β -D-glucopiranosilo (**35**) (figura 15).^[7]

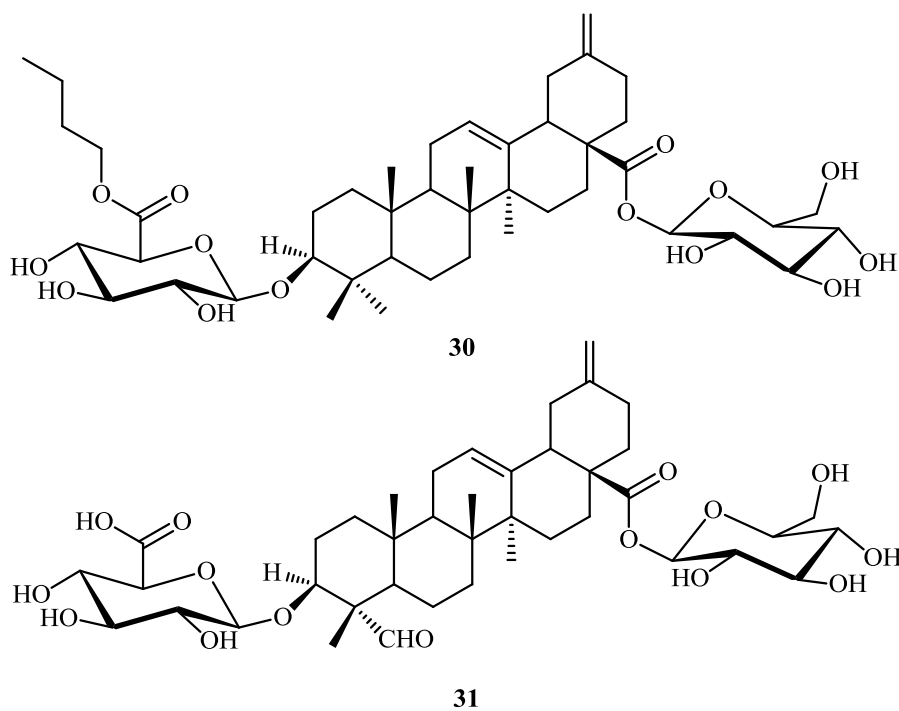


Figura 14 – Saponinas raras isoladas a partir de *S. bigelovii*

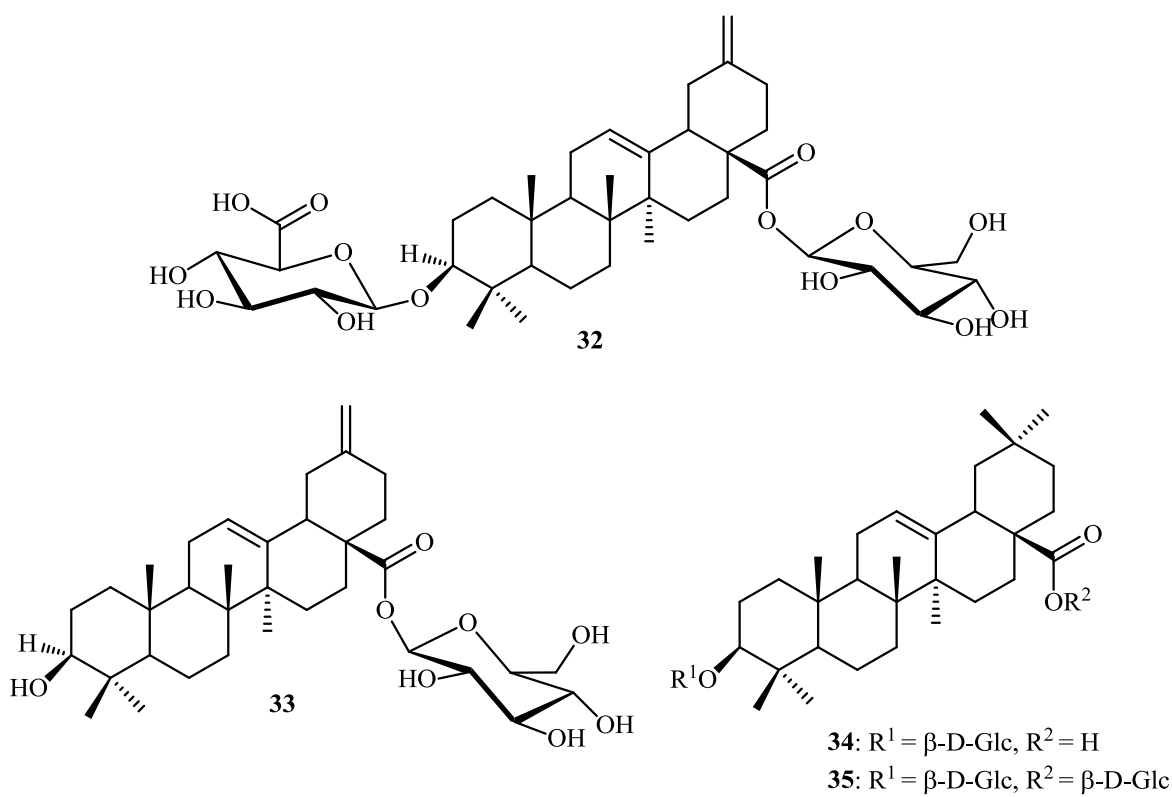


Figura 15 – Saponinas nortriterpenóides e triterpenóides isoladas a partir de *S. bigelovii*

A partir de partes aéreas de *S. bigelovii* foram isolados o β -caroteno (**36**) e o ácido ascórbico (**37**), cujas estruturas estão ilustradas na figura 16.^[40] Do óleo das sementes desta halófita foram extraídos os ácidos palmítico (**23**), oleico (**24**), linoleico (**25**) (figura 12) e esteárico (**38**), bem como tocoferóis (α -, β - e γ -) (**39**) (figura 17).^[22]

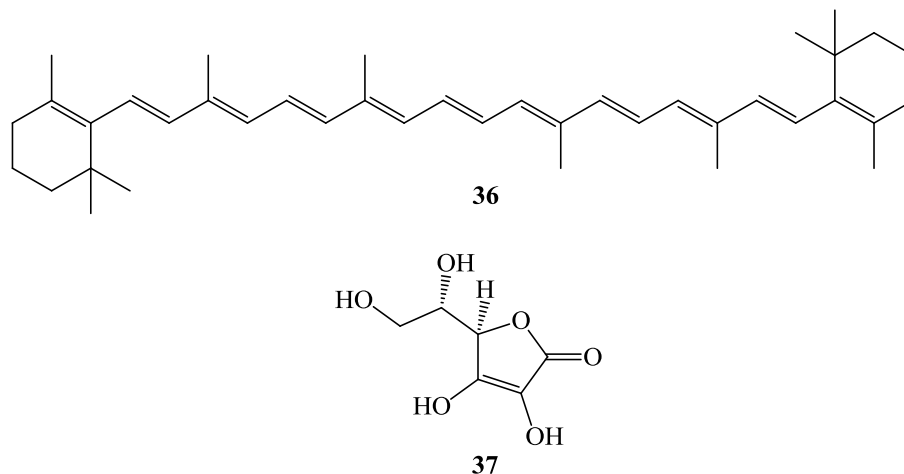


Figura 16 – Nutrientes isolados a partir das partes aéreas de *S. bigelovii*

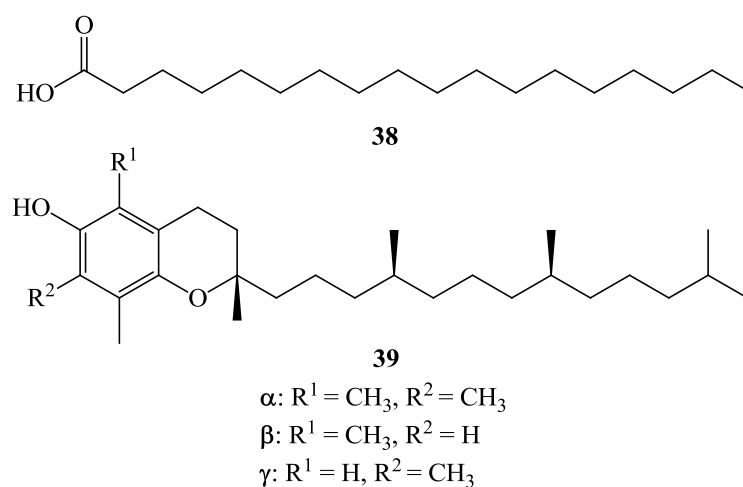


Figura 17 – Constituintes do óleo das sementes de *S. bigelovii*

A composição lipídica das sementes de *Salicornia* SOS-7 é dominada pelo ácido linoleico (**25**) (66,9%), seguida do ácido oleico (**24**) (17,5%), ácido linolénico (**26**) (figura 11) (1,4%) e apenas vestígios de ácido esteárico (**38**) (figura 17) e foram detetados 22 triglicéridos diferentes, por HPLC.^[66] El-Shami *et al.*,^[65] reportaram que as sementes possuem uma quantidade significativa de tocoferóis (**39**) (figura 17), principalmente α e γ .

Também foi reportada a existência de esteróis no óleo das sementes de *S. SOS-7*, principalmente o 7-estigmastenol (**40**), sitosterol (**41**), representados na figura 18; e esteróis glicosilados, maioritariamente os que envolvem o β -sitosterol e os que envolvem simultaneamente unidades de campesterol e estigmasterol.^[66]

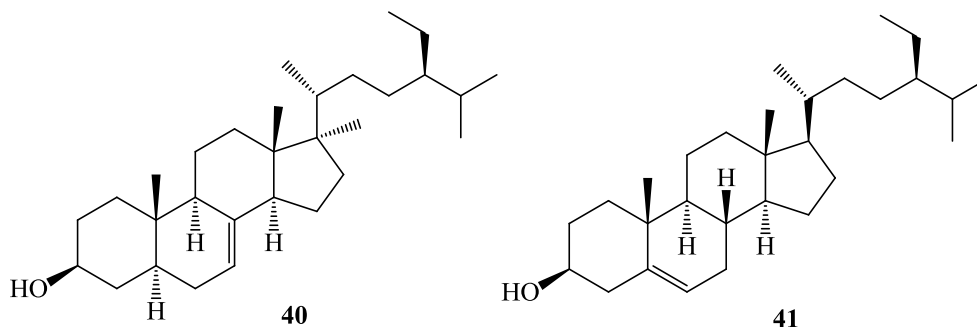


Figura 18 – Esteróis mais abundantes nas sementes da forma SOS-7

Outras espécies de *Salicornia* foram estudadas com o objetivo de se conhecer o seu perfil lipídico. Um exemplo é a *S. brachiata* que, ao contrário das plantas descritas anteriormente, revela maior quantidade de ácidos gordos saturados que insaturados, dos quais se destaca o ácido láurico (**42**) (figura 19) com uma percentagem de 61,85%.^[74] A análise por GC do extrato de hexano da mesma espécie mostrou ainda a presença dos ácidos undec-10-enóico (**43**) (37,85%) (figura 19), oleico (**24**) (32,79%), palmítico (**23**) (16,48%) (figura 12) e mirístico (**44**) (12,88%) (figura 19).^[60]

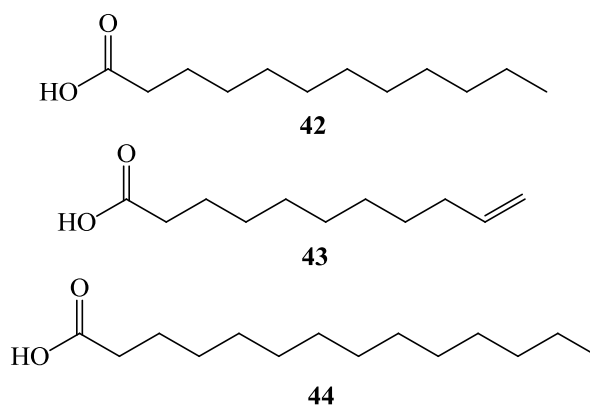


Figura 19 – Ácidos gordos identificados na *S. brachiata*

Outro exemplo de interesse é a *S. fruticosa* (atualmente classificada como *Sarcocornia fruticosa*) na qual, o ácido palmítico (**22**) (figura 12) é o composto maioritário dos ácidos gordos (aproximadamente 32,4%) enquanto o hentriacontanol ($C_{31}H_{64}O$,

22,15%) e o octatriacontanol ($C_{38}H_{78}O$, 21,53%) são os álcoois maioritários.^[105] Os mesmos autores identificaram o triterpeno α -amirina (**45**), o colesterol (**46**) (figura 20), o estigmasterol (**40**) (figura 18) e também descobriram que a mucilagem das partes aéreas hidrolisadas contém xilose (**47**), manose (**48**), galactose (**49**) (figura 20) e glucose (**4**) (figura 8).

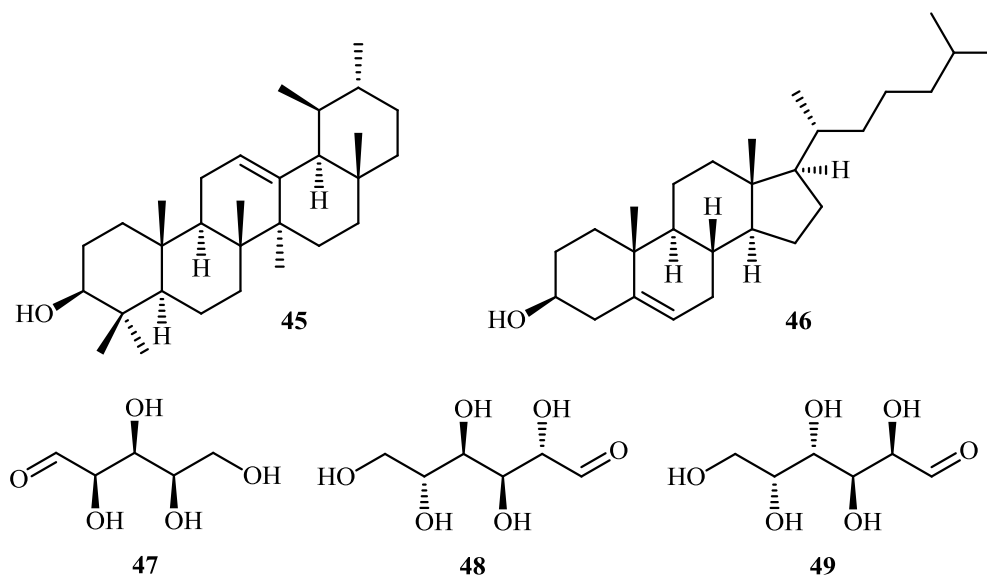


Figura 20 – Metabolitos isolados a partir da *S. fruticosa*

O extrato de metanol/água (80%) da *Sarcocornia fruticosa*, fracionado com clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol, permitiu também o isolamento de vários derivados de flavonas, nomeadamente, a apigenina (**50**), 7-(β -galactosiloxi)-apigenina (**51**), isoramnetina (**52**), 3-(β -galactosiloxi)-isoramnetina (**53**) e acetina (**54**) (figura 21).^[105]

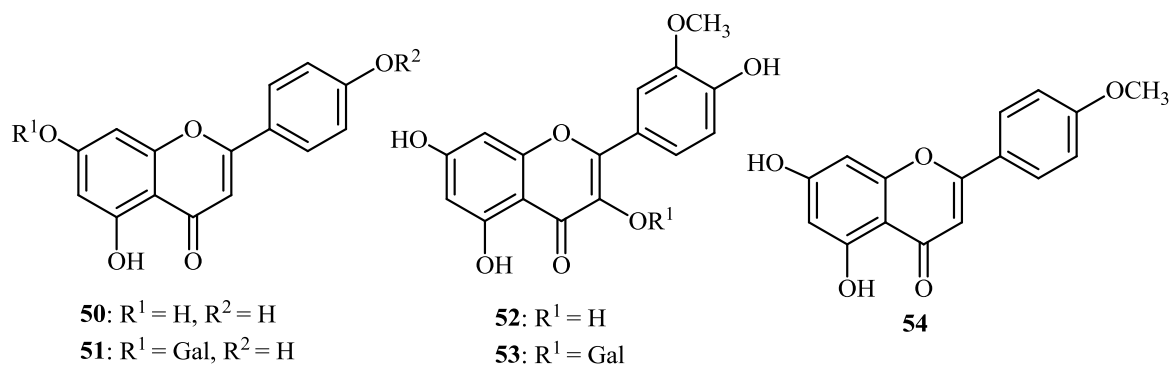


Figura 21 – Derivados de flavonas isolados a partir da *S. fruticosa*

Diversos autores dedicaram a sua atenção ao estudo fitoquímico da espécie *S. herbacea*, possivelmente devido à sua vasta aplicação na medicina tradicional. Esta espécie apresenta metabolitos secundários variados como o estigmasterol (**40**), o β -sitosterol (**41**) (figura 18) e o uracilo (**55**) (figura 22), isolados a partir do extrato metanólico, obtido a quente,^[106] e como os ácidos ferúlico (**2**) (figura 8), procatecuíco (**56**) e cafeico (**57**) (figura 22) e a isoramnetina (**52**) (figura 21), isolados a partir de extratos de metanol à temperatura ambiente.^[107] Os ácidos (**2**, **56** e **57**) descritos foram posteriormente isolados a partir do extrato aquoso de *S. herbacea* por Bi *et al.*^[108] e extraídos pelo método de SPE utilizando etanol e acetonitrilo/água/ácido trifluoracético como solventes por Han *et al.*^[109]

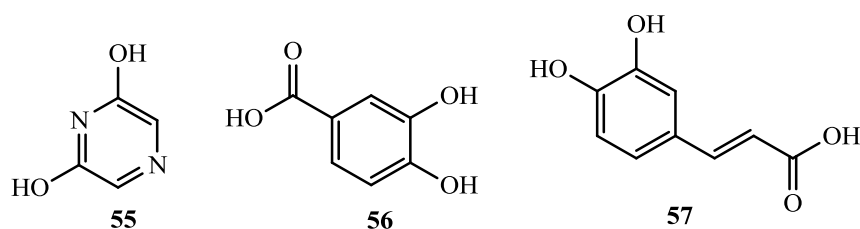


Figura 22 – Exemplos de metabolitos secundários presentes na *S. herbacea*

Recentemente, Essaidi *et al.*^[84] realizaram um extensivo estudo fitoquímico da *S. herbacea* colhida na Tunísia. Reportaram a existência de ácidos gordos no extrato de hexano, onde os ácidos insaturados linoleico (**25**) e α -linolénico (**26**) (figura 12) representam 62% do conteúdo total de ácidos gordos. Os ácidos palmítico (**23**), oleico (**24**) (figura 12), esteárico (**38**) (figura 17) e palmitoleico (**58**) (figura 23) também foram detetados nesta espécie, mas em quantidades menos significativas.

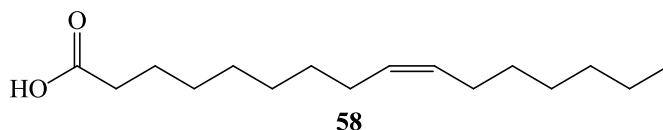


Figura 23 – Ácido palmitoleico, presente na *S. herbacea*

O estudo do extrato de metanol/água de *S. herbacea* revelou a presença de oito ácidos fenólicos, nomeadamente, os ácidos ferúlico (**2**) (figura 8), cafeico (**57**) (figura 22), cinâmico (**59**), *p*-cumárico (**60**), sinapínico (**61**), clorogénico (**62**) e salicílico (**63**) (figura 24) e oito flavonoides, a quercetina (**13**) (figura 9), a isoramnetina (**52**), a acacetina (**54**) (figura 21), a galangina (**64**), o campferol (**65**), a miricetina (**66**), a ramnetina (**67**) e a hesperetina (**68**) (figura 24).^[84]

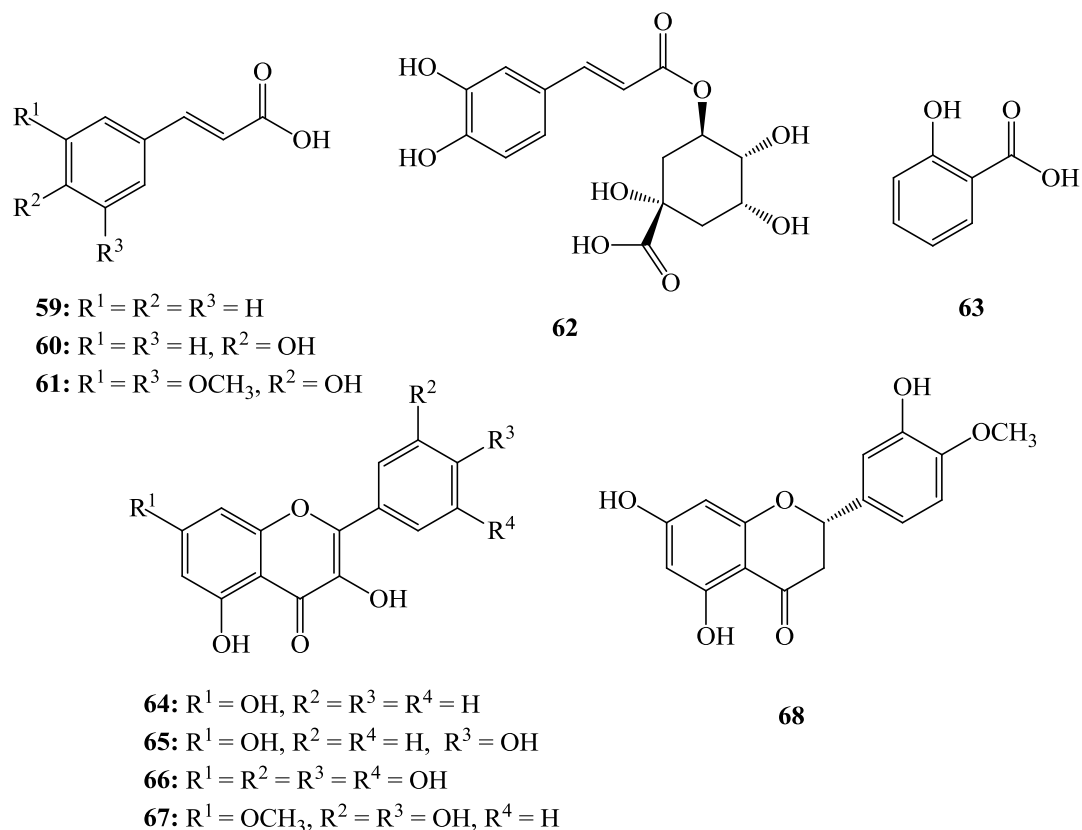


Figura 24 – Compostos fenólicos isolados a partir do extrato de metanol/água de *S. herbacea*

Também a isoquercitina (**14**) (figura 9) foi isolada desta espécie, a partir do extrato de n-butanol.^[9,110,111] A análise do extrato de metanol revelou a presença de vários derivados do ácido clorogénico, nomeadamente, o ácido 3-cafeoil-4-di-hidrocafeoilquínico (**69**) (também denominado de ácido tungtungmádico, derivado do nome vulgar desta espécie na Coreia),^[31,112] o 4-cafeoil-3-di-hidrocafeoilquinato de metilo (salicornato) (**70**), o ácido 3,4-dicafeoilquínico (**71**), o 3,5-dicafeoilquinato de metilo (**72**), o ácido 3,5-dicafeoilquínico (**73**) e derivados de flavonoides, isoquercitina (**14**) (figura 9), 3-(β-D-glucopiranosiloxi)isoramnetina (**74**) e o novo 6''-O-metiloxalato da isoquercitrina (**75**), (figura 26).^[31]

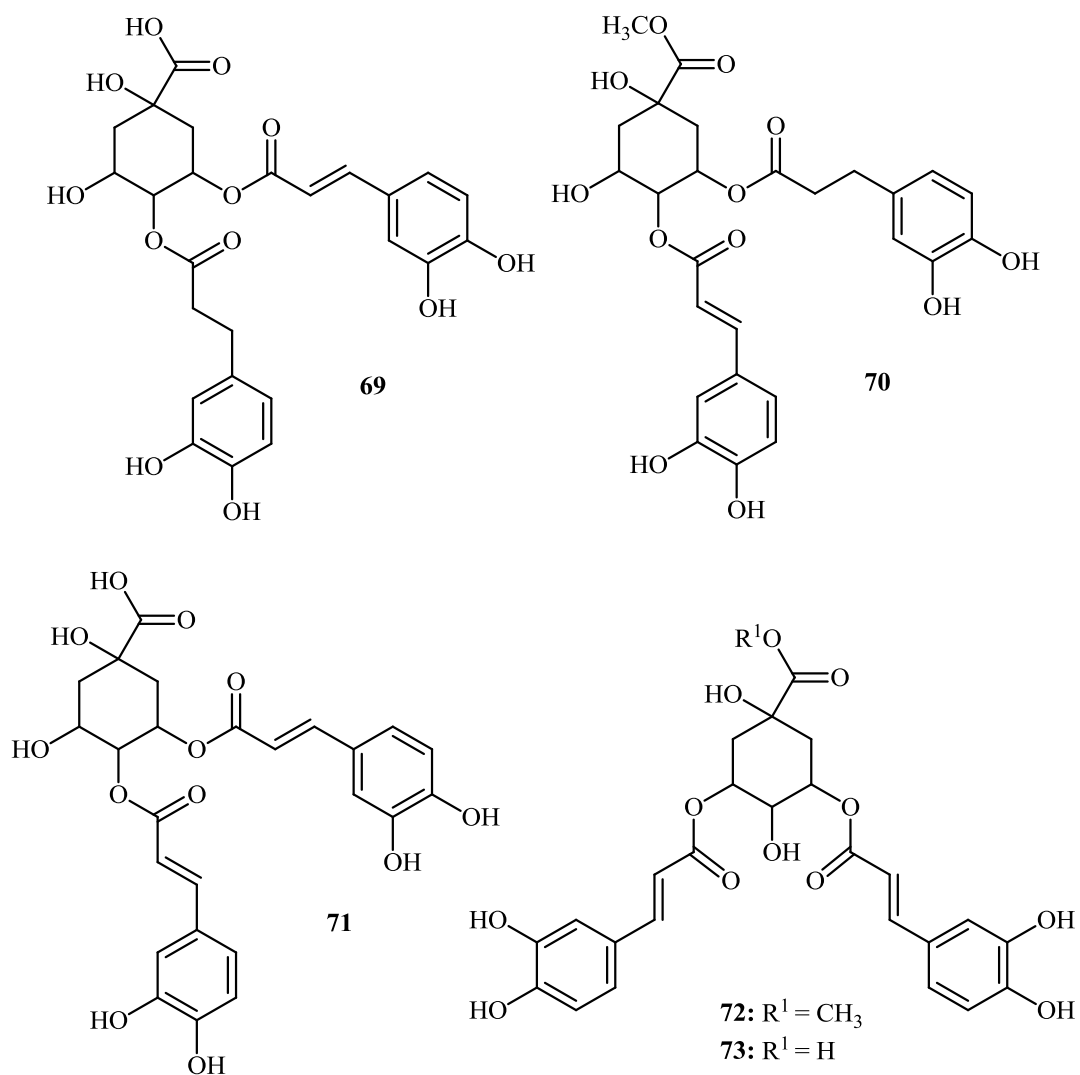


Figura 25 – Derivados de ácido clorogénico, isolados a partir de *S. herbacea*

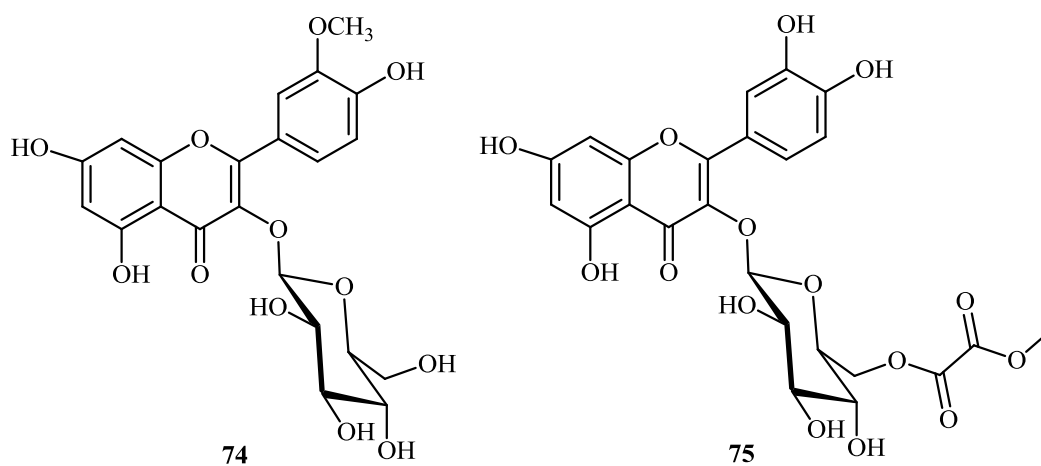


Figura 26 – Flavonoides glicosidados, isolados a partir de *S. herbacea*

Recentemente, foi isolada a saponina bigelovii B (**31**) (figura 14), a partir do extrato de n-butanol de *S. herbacea*,^[113] em conjunto com saponinas da família da gipsogenia, nomeadamente, a 3 β -(β -D-glucuronopiranosiloxi)-gipsogenina (**76**), a 3 β -(β -D-glucuronopiranosiloxi)-gipsogenina de glucopiranosilo (**77**), e a 3 β -(β -D-glucuronopiranosiloxi)-30-norhederagenina de glucopiranosilo (**78**) (figura 22).^[113]

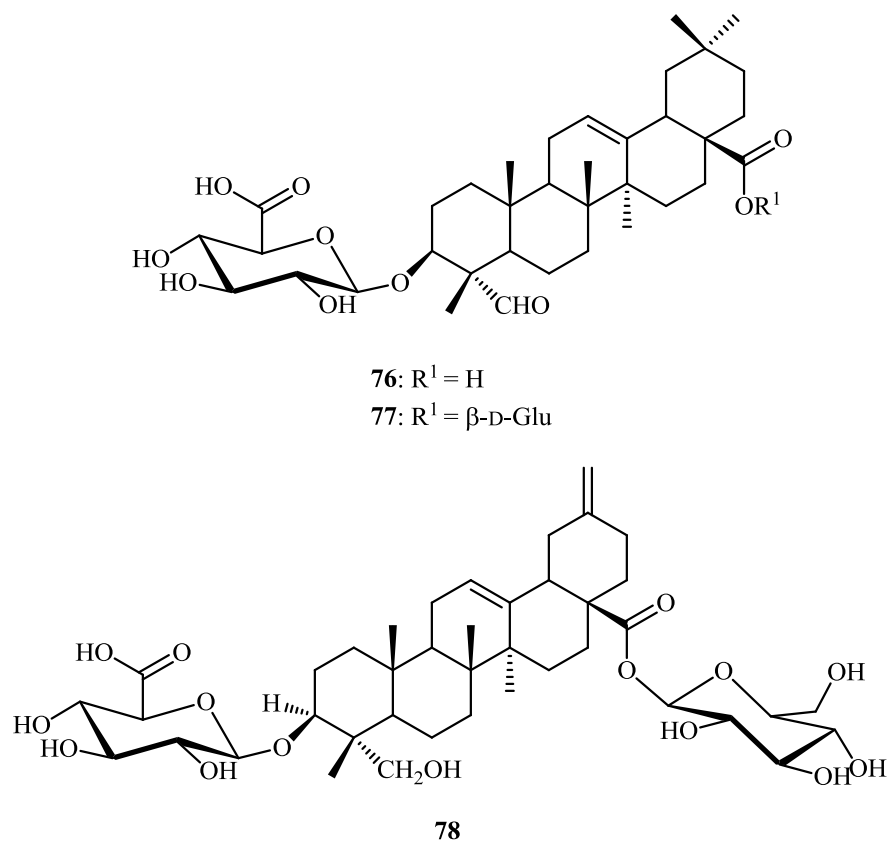


Figura 27 – Gipsogeninas isoladas de *S. herbacea*

Outros metabolitos secundários foram isolados recentemente a partir de um extrato de acetona de partes aéreas de *S. herbacea* fresca, nomeadamente os ácidos linoleico (**25**), linolénico (**26**) (figura 12) e esteárico (**38**) (figura 17), o estigmasterol (**25**) (figura 13), o ergosterol (**79**), o fitol (**80**), o (3Z,6Z,9Z)-tricoso-3,6,9-trieno (**81**), o ferulato de pentadecilo (**82**), a vanilina (**83**) e a escopoletina (**84**) (figura 28).^[114]

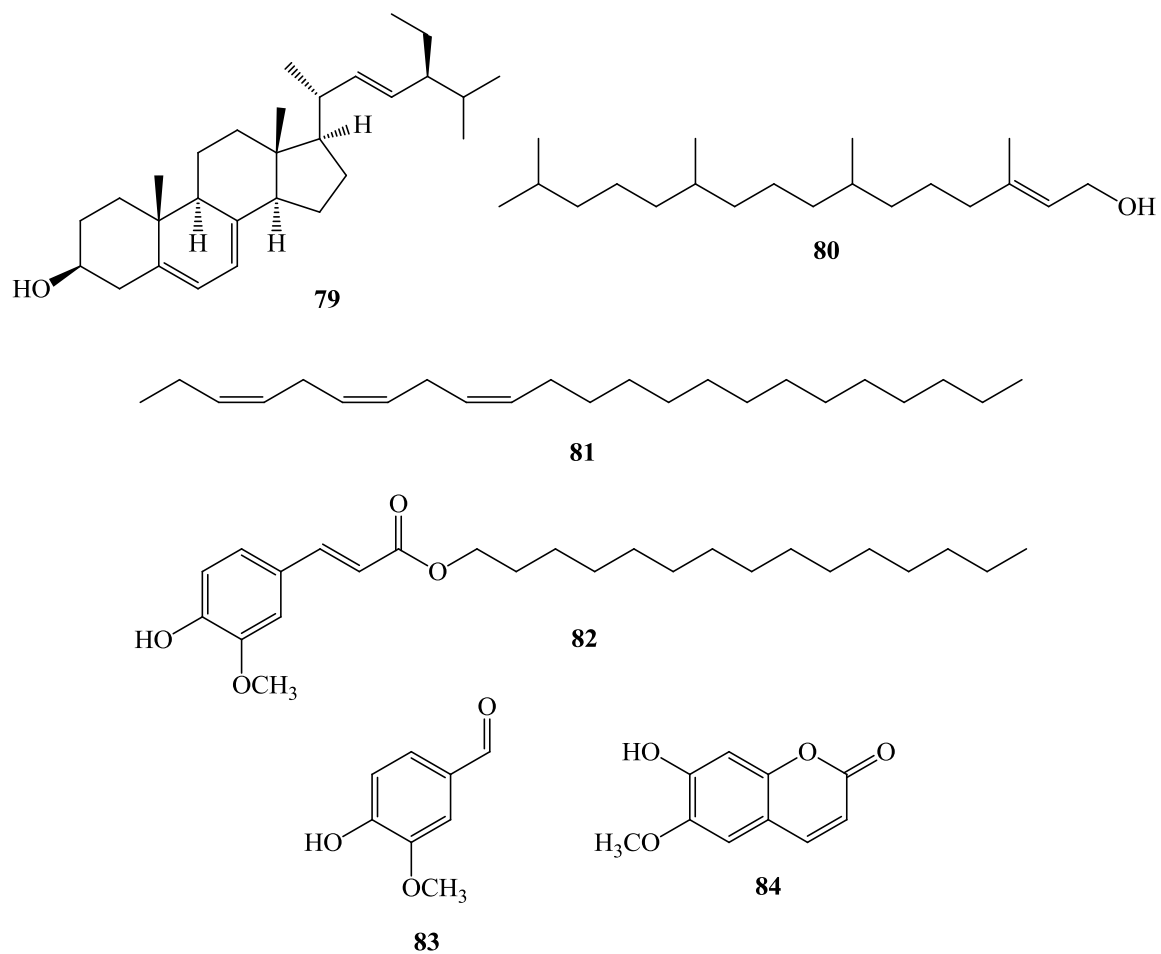


Figura 28 – Metabolitos isolados a partir do extrato de acetona de *S. herbacea*

1.5. Ação biológica dos compostos isolados

As propriedades atribuídas às plantas são frequentemente resultado de efeitos sinérgicos, por este motivo, não é possível a relação direta entre as atividades reportadas na medicina tradicional e os compostos puros. Contudo, os compostos encontrados em espécies de *Salicornia* foram sendo sujeitos a ensaios biológicos e revelaram atividades interessantes,^[6] as quais são de seguida apresentadas.

É do conhecimento geral que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante. Esta atividade pode ser explicada pela sua ação redutora, no qual os grupos hidroxilo desempenham um papel central, tornando os compostos fenólicos capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres.^[9]

Os ácidos ferúlico (**2**) (figura 8), procatecuíco (**56**) e cafeico (**57**) (figura 22), os derivados do ácido dicafeoilquínico (**69-73**) (figura 25), os compostos quercetina (**13**) (figura 10), isoarmnetina (**52**) (figura 21) e os seus respetivos derivados glucosilados, **14** (figura 10) e **74** (figura 26) exibem uma atividade antioxidante significativa, documentada em vários estudos.^[31,107] A atividade antioxidante dos ácidos ferúlico (**2**) (figura 8), procatecuíco (**56**) e cafeico (**57**) (figura 22), bem como da quercetina (**13**) (figura 10) e isoarmnetina (**52**) (figura 22) é superior à atividade dos compostos glicosilados correspondentes. Isto sugere que tratar os extratos enzimaticamente (a hidrólise enzimática é possibilitada pelo tratamento com 5 enzimas: α -amilase, amiloglucosidase, viscozima L, pectinase e celulase) permitirá obter soluções de extrato com maior atividade antioxidante.^[107]

As espécies reativas de oxigénio, tais como o radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), peróxido ($\text{ROO}\bullet$) e o anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) são responsáveis pelos danos do ADN e pela oxidação dos lípidos e proteínas.^[115] Dos compostos fenólicos apresentados, praticamente todos são eficientes captadores do anião superóxido e do radical hidroxilo. O ácido procatecuíco (**56**) e cafeico (**57**) (figura 22) destacam-se na captura do anião superóxido, com ação mais potente que a catequina (**85**) (figura 29), utilizada como referência, e, por outro lado, o ácido ferúlico (**2**) (figura 8) não exibe atividade. No entanto, este composto (**2**) é o mais eficiente na captura do radical hidroxilo.^[107] Também o ferulato de pentadecilo (**82**) e a escopoletina (**84**) (figura 28) apresentam uma forte atividade de captação de radicais hidroxilo e de aniões superóxido, bem como um eficiente poder redutor do ferro.^[114]

O método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) é um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade de captação de radicais, *in vitro*.^[115] Os compostos anteriores (**2**, **13**, **14**, **57**, **69-73**, **74**) exibem atividade antioxidante quando determinada pelo método do DPPH, com eficácia dependente da concentração.^[31,84] Pensa-se que o mecanismo de ação antioxidante dos ácidos ferúlico (**2**) (figura 8), e cafeico (**57**) (figura 22) ocorre via inibição direta, relacionada com a capacidade do fenol de doar um átomo de hidrogénio.^[84] Os derivados do ácido dicafeoilquínico (**69-73**) (figura 25) apresentam ação semelhante entre si, o que revela que a posição do grupo cafeioilo não é relevante para a atividade. A atividade antioxidante aumenta proporcionalmente ao número de grupos cafeioilo (mono e dicafeioilo), independentemente das restantes alterações estruturais.^[31] Destes compostos destaca-se o ácido tungtungmádico (**69**) (figura 25) que apresenta atividade maior que outros antioxidantes conhecidos como o ácido clorogénico (**62**) (figura 24), ácido cafeico (**57**) (figura 22), ácido ferúlico (**2**) (figura 8) e α -tocoferol (**39**) (figura 17).^[112] Estudos sobre o mecanismo de ação do composto **69**, em sistemas celulares, mostraram que este composto capta eficazmente o radical hidroxilo e, consequentemente, inibe a peroxidação lipídica.^[112]

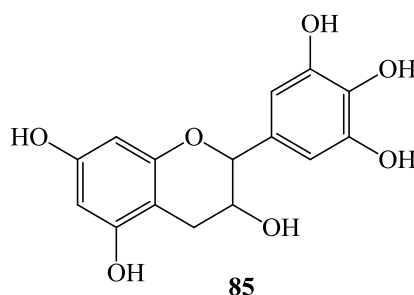


Figura 29 – Antioxidante conhecido

A eficácia da isoquercitrina (**14**) (figura 10) na captação de radicais, determinada pelo método do DPPH, é comparável à da quercetina (**13**) (figura 10), atingindo um valor de 60% de inibição do radical DPPH[•], para uma concentração máxima de 10 μ M, sem toxicidade significativa para o organismo.^[9] Contudo, o composto 3-(β -D-glucopiranosiloxi)-isoramnetina (**74**) (figura 26) é ligeiramente menos eficaz que o anterior, facto que poderá ser explicado pela presença do grupo metoxilo no anel B em vez do grupo hidroxilo existente na mesma posição no composto (**14**) (figura 10).^[23]

No entanto, estudos em condições intracelulares mostram que o composto **74** (figura 26) é um antioxidante eficaz. De facto, o seu mecanismo de ação dentro da célula passa pela indução do aumento dos níveis das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GSH e HO-1) e pela inibição da atividade da MOP (enzima que contribui para o stress oxidativo e inflamação), inibindo assim os potenciais danos oxidativos no ADN.^[116] Do mesmo modo, também o composto **14** (figura 10) apresenta uma elevada atividade antioxidante celular, contudo, é menos eficiente no que diz respeito ao aumento dos níveis de GSH, que o composto **74** (figura 26).^[9] Kong *et al.*^[111] sugerem que a isoquercitrina (**14**) (figura 10) pode ser também o composto responsável pelo potente efeito anti-hiperlipidémico de *S. herbacea*.

As ROS podem ativar positivamente várias metaloproteínas de matriz (MMPs) que desempenham um papel fundamental em processos patológicos, tais como inflamação, artrite, doenças cardiovasculares, pulmonares e no desenvolvimento de metástases. A MMP-9 é a principal MMP envolvida na iniciação e crescimento tumoral em tipos vários cancros.^[9] Estudos levados a cabo por Kong *et al.*^[24] revelaram que os compostos **16** (figura 10) e **74** (figura 24) possuem capacidade de inibir a atividade da MMP-9 e da MMP-2. A eficácia da inibição é dependente da concentração dos compostos.^[24] Também o ácido tungtungmádico (**69**) (figura 25) inibe potentemente a atividade de MMPs, e consequentemente, inibe o desenvolvimento de células tumorais.^[117] Este composto também é responsável pela supressão da necrose hepática^[118,119] e ação anti-inflamatória,^[117] podendo ter utilidade no tratamento de cancro e doenças do fígado.^[118,119]

A aldose redutase é uma enzima associada a complicações da diabetes, como neuropatias, nefropatias e retinopatias. O composto 3-(β -D-glucopiranosiloxi)-isoramnetina (**74**) (figura 26) tem capacidade de inibir significativamente esta enzima, de um modo dependente da concentração.^[82] Um estudo de Lee *et al.*,^[82] realizado em ratinhos, mostra que o composto tem a capacidade de diminuir a glucose sanguínea. Assim, este composto pode ser um promissor composto líder para tratamento da diabetes e das suas complicações.^[82]

O composto **74** (figura 26) também foi indicado como anti-adipogénico, uma vez que suprime a diferenciação dos adipócitos, portanto, também será um potente candidato anti-obesidade aliviando a acumulação de lípidos.^[111] Similarmente, o ácido tungtungmádico (**69**) (figura 25) apresentou capacidade de inibir a acumulação dos lípidos,

por bloqueio da expressão da SREBP-1c e da FAS. O que sugere que o ácido **69** desempenha um papel preponderante na prevenção da lipogénese.^[120]

Outro exemplo interessante é o efeito algicida de *S. europaea* que, recentemente, foi atribuído ao flavonol rutina (**15**) (figura 10), encontrado nas raízes desta planta.^[29]

A ação anti-inflamatória de *S. herbacea* é atribuída à presença de polissacarídeos,^[68] no entanto, o mecanismo não está elucidado. O seu efeito é comparável com o de outros polissacarídeos isolados de plantas medicinais como, por exemplo, da *Aloe vera* ou *Panax ginseng*.^[35,68] Está, de facto, comprovado que os polissacarídeos estimulam os macrófagos a produzir NO, e este está relacionado com a função citotóxica dos macrófagos contra uma variedade de tumores.^[121]

As enzimas do citocromo P450 (CYPs) estão envolvidas na ativação da carcinogénese. Os ácidos fenólicos e os flavonóis presentes no extrato de metanol da *S. herbacea* são responsáveis pela forte inibição do citocromo P450. Nomeadamente, os compostos quercetina (**13**) (figura 10) e caempferol (**65**) (figura 24), que apresentam um grupo hidroxilo substituinte na posição 3, são fortes inibidores de CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4, embora o mecanismo de ação não esteja elucidado.^[84]

O ácido linolénico (**26**) (figura 12), o fitol (**80**) e o ferulato de pentadecilo (**82**) (figura 28), presentes no extrato de acetona de *S. herbacea*, apresentam atividade anti-proliferativa. O fitol (**80**) (figura 28) tem capacidade de inibir seletivamente as células HepG2 (células cancerígenas do fígado humano). O ácido linolénico (**26**) (figura 12) e o ferulato de pentadecilo (**82**) (figura 28) inibem fortemente tanto o crescimento das células HepG2, como das A549 (linhas celulares cancerígenas do pulmão humano).^[114]

As saponinas triterpénicas isoladas a partir de *S. herbacea* e *S. bigelovii* também suscitaram curiosidade relativamente à sua atividade biológica. As saponinas triterpénicas (**31**) (figura 14) e (**76-78**) (figura 22) não apresentam atividade significativa no ensaio do DPPH, mas demonstram uma atividade relativamente boa em relação ao ONOO⁻.^[113] Um estudo recente avaliou a citotoxicidade das saponinas 30-nortriterpenoides bigelovii A (**30**), bigelovii B (**31**) (figura 14), pfaffina B (**32**) e boussingosedeo A₂ (**33**) (figura 15) contra linhas celulares HL-60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (cancro da mama), HepG2 (cancro do fígado) e A549 (cancro do pulmão). Os resultados indicaram que apenas bigelovii A (**30**) e pfaffina B (**30**) (figura 15) são moderadamente ativas contra HL-60, MCF-7 e HepG2.^[7]

O género *Salicornia* é composto por plantas conhecidas pelas suas diversas propriedades nutricionais, aplicações farmacológicas e tradicionais. Por outro lado, foram isolados em espécies *Salicornia*, uma variedade de compostos com interessantes e importantes atividades biológicas. Contudo, sobre a espécie *S. ramosissima* pouco ou nada se conhece. Assim, cresce o interesse no estudo desta espécie da Ria de Aveiro.

2. Análise do extrato de hexano das partes aéreas de *S. ramosissima*, por GC-MS

2.1. Introdução

O extrato de hexano obtido a partir das partes aéreas de *S. ramosissima* que cresceu em condições de irrigação diferentes foi analisado por cromatografia gasosa acoplada com detetor de massa (GC-MS). O GC-MS é uma técnica de análise bastante útil na identificação de metabolitos lipofílicos. Esta técnica destina-se apenas à análise de compostos voláteis ou que se podem tornar voláteis por derivatização, possibilitando a separação, identificação e quantificação dos mesmos. Os derivados trimetilsililados são vantajosos numa análise GC-MS na medida em que a sililação aumenta a volatilidade dos compostos e, consequentemente melhora a separação cromatográfica.^[122-124]

A identificação dos compostos correspondentes a cada pico cromatográfico é feita com recurso a espectros de massa.^[122,124] O padrão de fragmentação é típico para cada família de compostos, o que permite a identificação inequívoca da classe de compostos em questão. A abundância relativa e os valores de razão massa/carga (m/z) dos picos presentes no espectro de massa constituem uma excelente ferramenta para a determinação da estrutura dos metabolitos detetados no cromatograma.

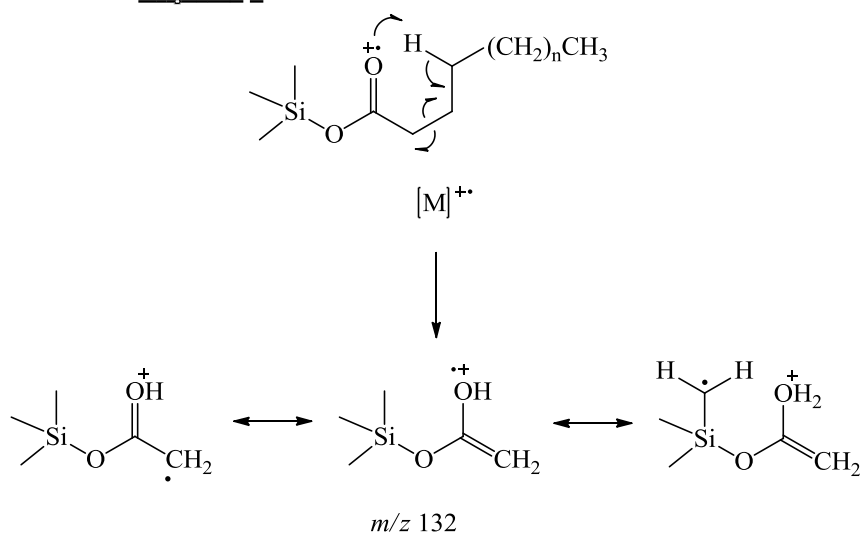
De seguida, apresentam-se alguns dos fragmentos caraterísticos exibidos nos espectros de massa obtidos por ionização eletrónica, para cada uma das famílias de compostos identificados nos cromatogramas dos extratos de hexano de *S. ramosissima*.

Fragmentos típicos de cada família de compostos identificados

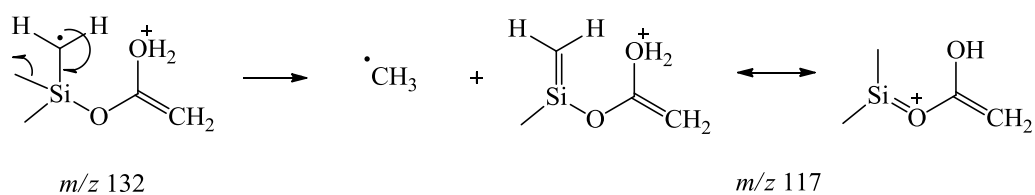
a) Ácidos gordos saturados

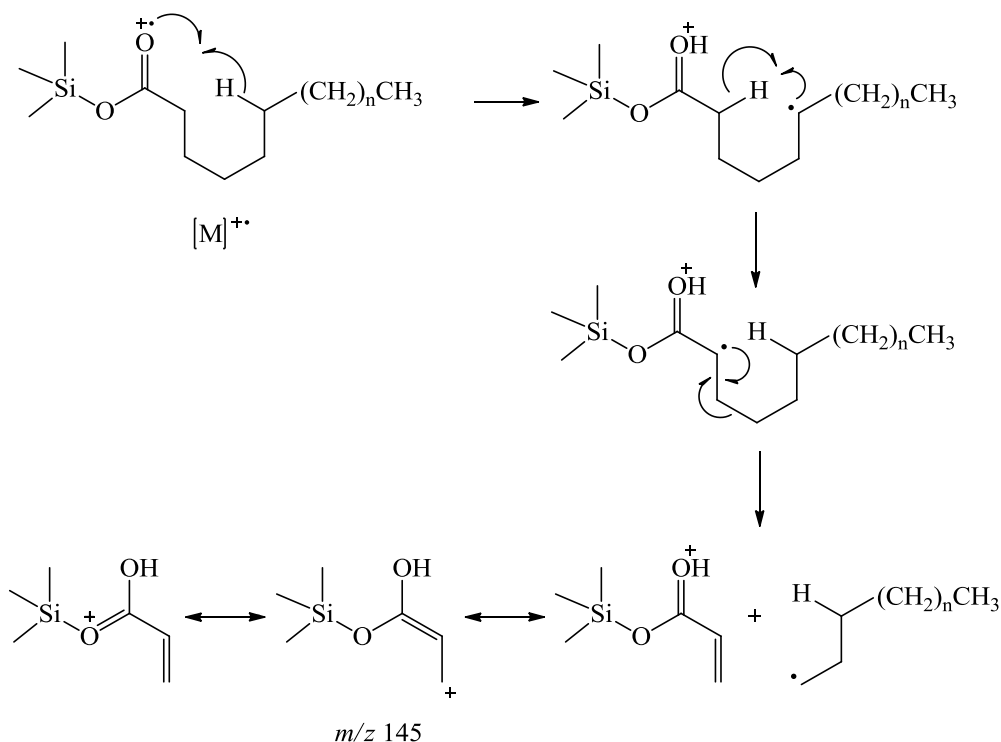
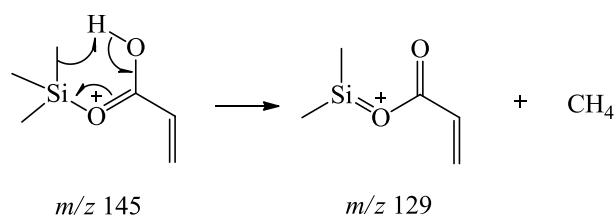
Os derivados trimetilsililados de ácidos gordos (ácidos gordos-TMS) são facilmente identificáveis por GC-MS. Os seus espectros de massa apresentam um padrão de fragmentação típico que se caracteriza pela presença dos picos a m/z 117, 129, 132 e 145. A formação dos fragmentos correspondentes está exemplificada nos esquemas 1, 2, 3 e 4.^[125]

Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3**Esquema 4**

Os fragmentos resultantes do grupo derivatizante, picos a m/z 73, 75 e o correspondente ao íon $[M-90]^+$ (figura 30) também são comuns nos espectros de massa dos ácidos gordos-TMS. O fragmento $[M-15]^+$ corresponde à perda de um grupo metilo do grupo TMS (esquema 5) e é frequentemente o íon mais abundante nos espectros de massa de ácidos gordos.^[126] Este é uma mais-valia na identificação do peso molecular do ácido em questão.^[125]

Outro aspeto característico desta família de compostos é que o pico correspondente ao íon molecular ($M^{\bullet+}$) apresenta uma abundância relativamente baixa ou inexistente.^[125]

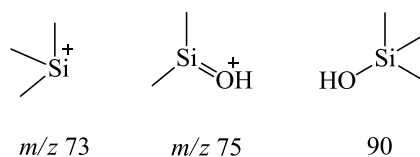
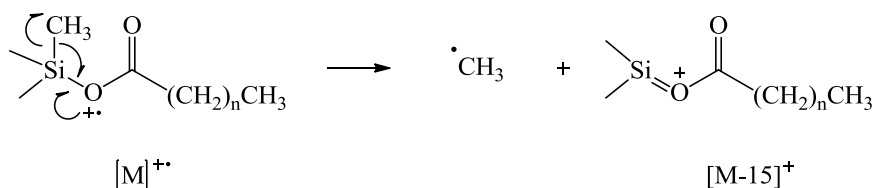


Figura 30 – Fragmentos caraterísticos do grupo derivatizante, em ácidos gordos saturados-TMS

Esquema 5



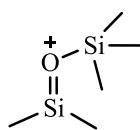
b) Ácidos gordos insaturados

O espectro de massa de um ácido gordo insaturado-TMS apresenta os mesmos picos que o dos ácidos gordos saturados, ou seja, os picos a m/z 73, 75, 117, 129, 132 e 145 e o correspondente aos fragmentos $[\text{M}-90]^+$ e $[\text{M}-15]^+$. A grande diferença nos espectros de massa dos insaturados, em comparação com os saturados, é a abundância relativa do pico correspondente ao fragmento $[\text{M}-15]^+$. Há medida que se aumenta o grau de insaturação este pico diminui de intensidade. Por exemplo, para um ácido trienóico o ião $[\text{M}-15]^+$ surge com uma abundância relativa baixa. Esta caraterística fornece um indício do grau de insaturação do ácido em questão. No entanto, existe pouca informação relativamente à determinação da posição das insaturações, não sendo conhecido qual dos picos, no espectro, indica a localização exata das duplas ligações.^[125] A determinação da posição e geometria das duplas ligações só é possível por comparação com espectros de massa de compostos padrão^[127] e espectros da biblioteca do aparelho utilizado.

c) Diácidos

Do mesmo modos que os restantes ácidos abordados atrás também os espectros de diácidos-TMS apresentam os picos a m/z 73, 75, 117, 129, 132 e 145 e o correspondente aos fragmentos $[M-90]^+$ e $[M-15]^+$. Os fragmentos correspondentes a m/z 73, 75 caracterizam-se por abundancias muito elevadas, sendo que em alguns casos, um deles corresponde ao pico base. O pico correspondente ao ião $[M-15]^+$ exibe abundância relativa reduzida.^[128]

Os fragmentos característicos dos derivados TMS de diácidos incluem os iões de m/z 147 (figura 31) com intensidade relativa muito elevada, e o pico correspondente ao fragmento $[M-15-44]^+$, com intensidade moderada. O fragmento com m/z 147 resulta da transposição do grupo TMS, com posterior decomposição da molécula, enquanto o fragmento $[M-15-44]^+$ corresponde à perda de $\bullet\text{CH}_3$, pelo ião molecular (já referida atrás) seguida de descarboxilação..^[128]



m/z 147

Figura 31 – Fragmento caraterístico dos diácidos-TMS

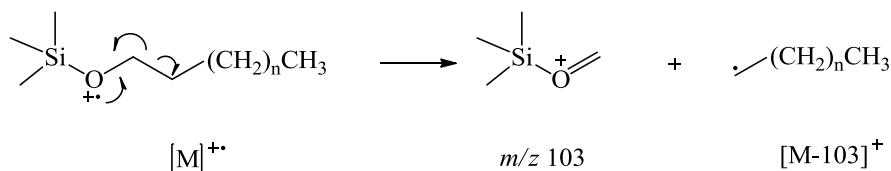
d) Álcoois

Os derivados TMS de álcoois são uma classe de compostos em cujo o espectro de massa se observam apenas os picos a m/z 73 e 75 com abundância reduzida, o ião $M^{+\bullet}$ também com abundância muito reduzida ou por vezes ausente, e o ião $[M-15]^+$ correspondente ao pico base. Tal como foi explicado no ponto relativo aos ácidos gordos, os iões com m/z 73 e 75 e o fragmento $[M-15]^+$ são derivados de fragmentações do grupo derivatizante.^[127]

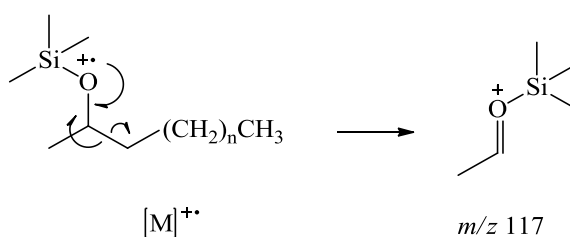
Existem ainda dois fragmentos típicos correspondentes aos picos a m/z 103 e 117 que dependem do tipo de álcool em questão. Por exemplo, os derivados TMS de álcoois

primários lineares caracterizam-se pela presença do ião a m/z 103 (esquema 6), com uma abundância reduzida. No caso de um álcool secundário, o ião característico surge a m/z 117 (esquema 7).^[127]

Esquema 6

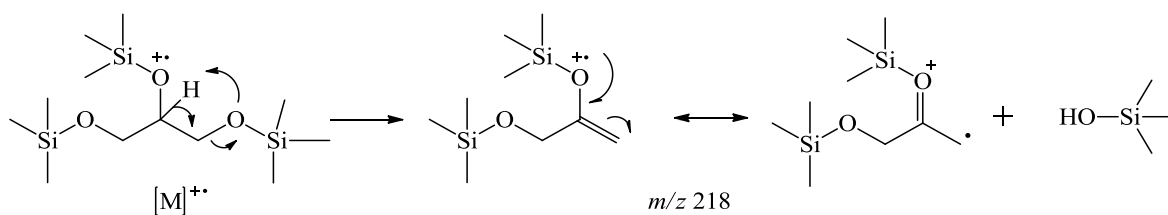
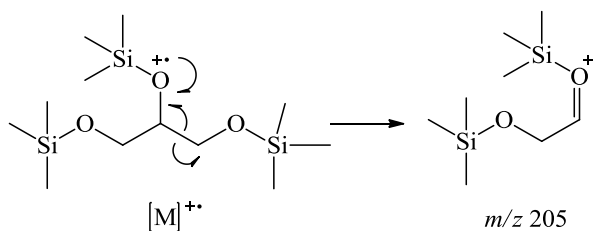


Esquema 7



O espectro de massa dos álcoois insaturados-TMS, diferencia-se dos anteriores apenas na abundância relativa dos picos. Os fragmentos típicos são os mesmos que no correspondente saturado, no entanto, o ião mais abundante é o pico a m/z 75, ao invés do $[M-15]^+$. O ião $M^{\bullet+}$ passa agora a ser detetável pela presença no espectro do respectivo pico com uma abundância relativa de baixa a razoável.^[127]

Os derivados TMS de poliálcoois apresentam padrões de fragmentação específicos. Os diois vicinais (por exemplo 1,2-diols) caracterizam-se pela presença dos dois iões, com m/z 103 e $[M-103]^+$, em simultâneo. O fragmento $[M-103]^+$ corresponde ao pico base do espectro.^[127] Por outro lado, um espectro de triálcoois caracteriza-se pela presença simultânea dos picos a m/z 103 e 117. Por exemplo, no caso do espectro de massa do glicerol, verifica-se a presença dos picos a m/z 103, 117, 205 e 218 e o correspondente ao fragmento $[M-15]^+$. Os fragmentos com m/z 205 e 218 são característicos deste composto e os mecanismos de fragmentação que os originam são apresentados nos esquemas 8 e 9.^[127,129]

Esquema 8**Esquema 9**

e) Esteróis

Os espectros de massa dos derivados de esteróis-TMS caracterizam-se pela presença de um grande número de picos com abundâncias relativas de moderadas a elevadas. Nem todos os fragmentos encontrados nestes espectros são fundamentais para a identificação dos esteróis.

O grupo TMS direciona fortemente a fragmentação pelo que os espectros de massa dos esteróis-TMS são caracterizados pela presença de um grande número de fragmentos com grupos TMS. Os fragmentos a m/z 73 e 75 são comuns aos espectros de massa de todos esteróis-TMS e, normalmente, não fornecem informação estrutural relevante. Para uma melhor compreensão das fragmentações que podem ocorrer nesta classe de compostos, a figura 32 ilustra a estrutura química geral de um esterol-TMS, com a respetiva numeração dos carbonos e nomenclatura dos quatro anéis presentes.

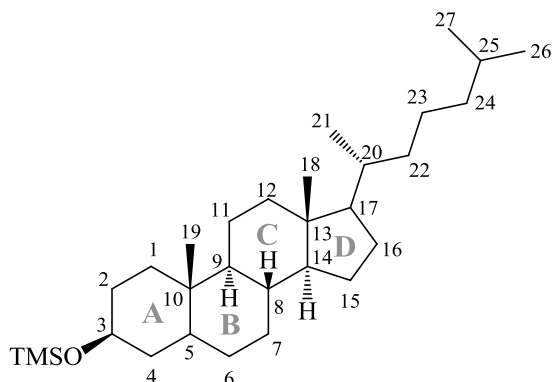
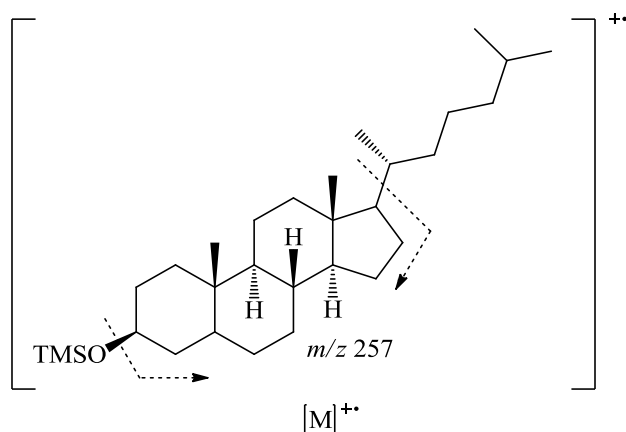


Figura 32 – Estrutura geral de um esterol-TMS

Os espectros de esteróis-TMS caracterizam-se pela presença de um pico muito abundante, a m/z 257. Este pico corresponde ao fragmento $[M-CL-TMSOH]^+$, o qual resulta de uma dupla fragmentação. Dá-se a perda da cadeia lateral (CL) completa, com quebra nos carbonos C-17/C-20, acompanhada de transferência de dois prótons (17α -H e 14α -H) e migração do grupo metilo do C-18 para o C-17. Na posição C-3 há perda de grupo derivatizante na forma de TMS-OH.^[130,131] Na figura 33 estão indicadas as fragmentações referidas.

Figura 33 – Locais de fragmentação para dar origem ao ião com m/z 257

Uma fragmentação consequente origina o ião $[M-CL-42-TMSOH]^+$, que corresponde ao pico a m/z 215. A perda de 42 corresponde à perda de C_3H_6 do anel D.^[130-132] Os locais de quebra que originam o fragmento com m/z 215 encontram-se ilustrados na figura 34.

Os picos descritos (m/z 257 e 215) são referentes a esteróis saturados. No caso de um esterol com uma insaturação no sistema de anéis ABC (o local da insaturação é indiferente), ocorrem os mesmos processos de fragmentação obtendo-se os fragmentos com m/z 255 e 213. O fragmento $[M-CL-42-TMSOH]^+$ é preponderante para identificar o número de insaturações nos anéis A, B e C.^[130] Por outro lado, este fragmento, permite determinar a massa da cadeia lateral dos esteróis. A diferença de massa entre o ião molecular e o ião $[M-CL-42-HOTMS]^+$ (atenção que deve somar-se 42+90) corresponde à massa da cadeia lateral.^[132]

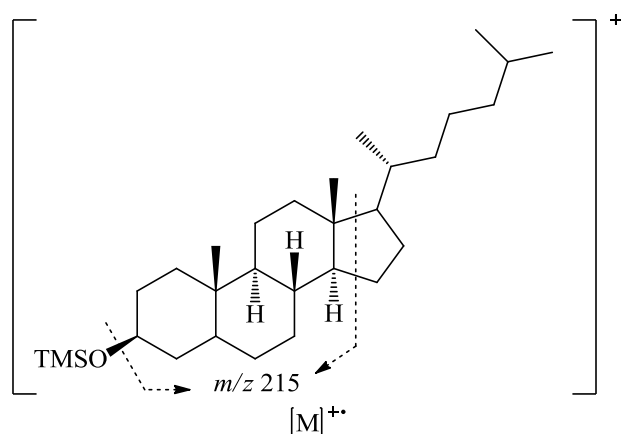


Figura 34 – Locais de fragmentação para dar origem ao ião com m/z 215

São ainda comuns os picos correspondentes aos fragmentos $[M-15]^+$, $[M-89-H]^+$, $[M-89-H-CH_3]^+$ e $[M-129]^+$, com abundâncias moderadas, os quais fornecem informação estrutural.^[132] A figura 35 ilustra os locais de fragmentação que originam estes íões.

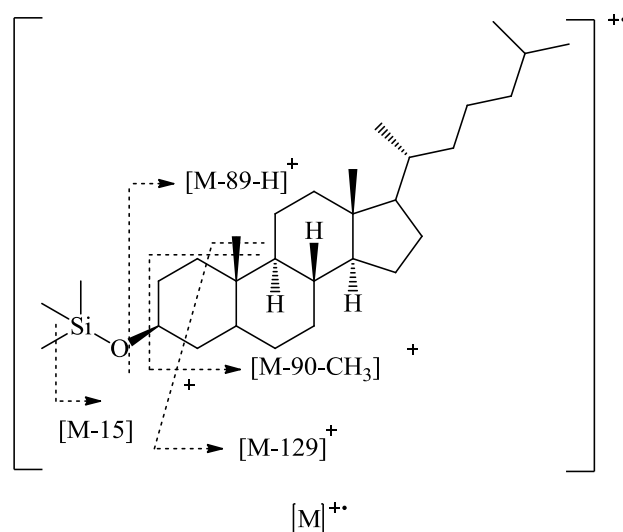


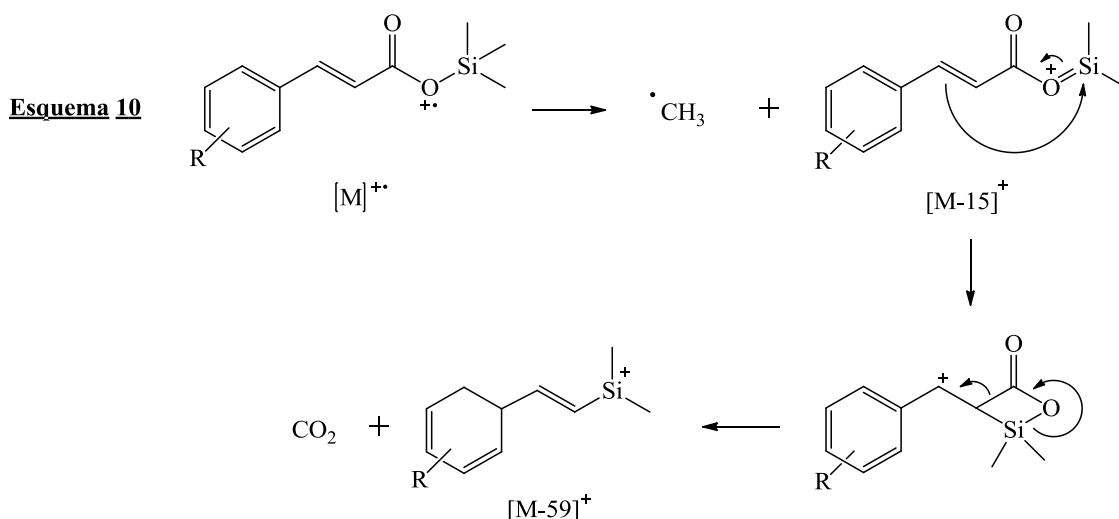
Figura 35 – Locais de fragmentação dos íões $[M-15]^+$, $[M-89-H]^+$, $[M-90-CH_3]^+$ e $[M-129]^+$

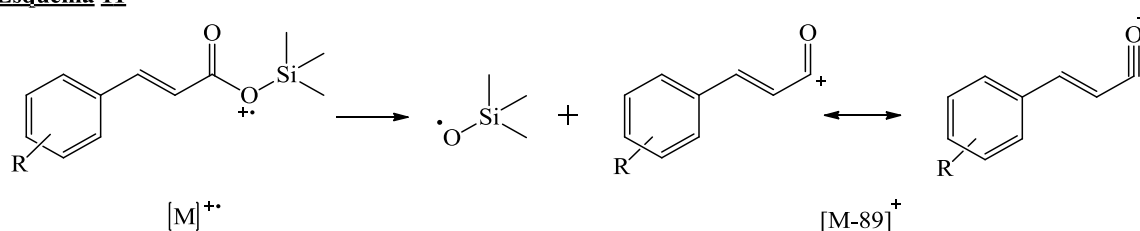
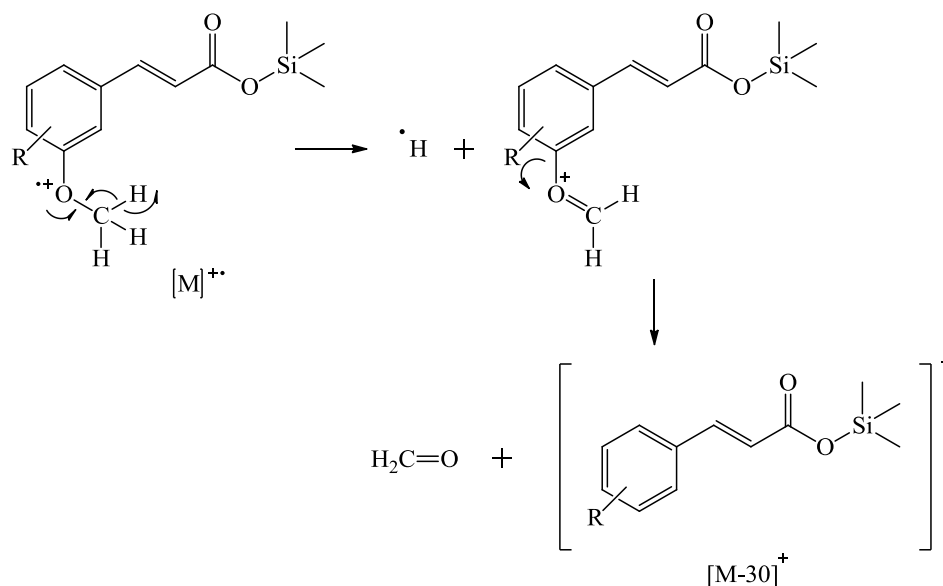
f) Compostos aromáticos

O anel benzênico é uma estrutura estável e por este motivo normalmente não sofre muita fragmentação. Contudo, a derivatização por sililação origina padrões de fragmentação característicos. Na maioria dos casos, os picos correspondentes aos íons $M^{+\bullet}$ e $[M-15]^+$ são os mais abundantes.^[126]

Outros fragmentos característicos de derivados aromáticos-TMS incluem os íons $[M-59]^+$ e $[M-89]^+$. O íon $[M-15]^+$ sofre um rearranjo e uma descarboxilação, dando origem ao fragmento $[M-59]^+$, de acordo com o mecanismo ilustrado no esquema 10.^[126] O fragmento $[M-89]^+$ caracteriza-se por uma abundância relativamente elevada, a qual pode estar relacionada com a estabilidade do catião formado (conjugação total das ligações insaturadas).^[126] O mecanismo que exemplifica a formação deste catião é apresentado no esquema 11.

Os derivados do ácido cinâmico-TMS com um substituinte metóxilo no anel aromático caracterizam-se pela presença, no espectro de massa, do pico correspondente ao fragmento $[M-30]^+$. A fragmentação envolve a perda de uma molécula de formaldeído e representa a clivagem do substituinte metóxilo do anel, originando o catião $[M-30]^+$ esquema 12.^[126]



Esquema 11**Esquema 12**

g) Alcanos

Os alcanos são os compostos mais simples, e por este motivo, também são os compostos que apresentam os padrões de fragmentação mais simples. Nos espectros de massa destes compostos é comum a presença do íon $\text{M}^{+\bullet}$, o que permite a identificação do alcano em questão. Contudo, a abundância relativa do íon molecular é bastante reduzida, o que dificulta a identificação inequívoca dos alcanos. São também frequentes o fragmento $[\text{M}-15]^+$ e os picos a m/z 43, 57, 71, 85, com intensidades relativas elevadas. Estes fragmentos diferem apenas 14 unidades entre si, o que corresponde à perda de grupos $-\text{CH}_2$ progressivamente.^[127] O esquema 13 ilustra o mecanismo de fragmentação que ocorre nos alcanos e a figura 36 os respectivos fragmentos resultantes.

Esquema 13

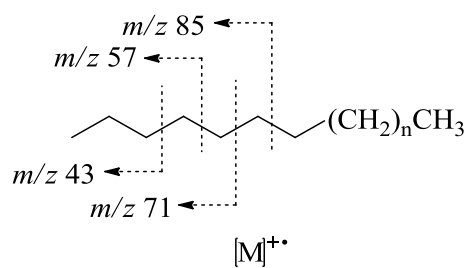
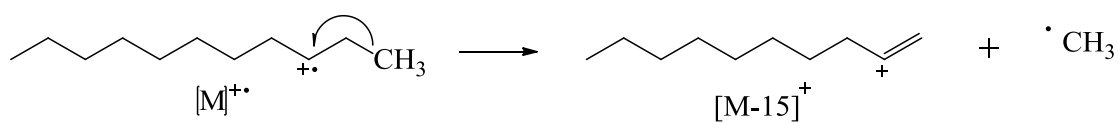


Figura 36 – Fragmentos caraterísticos dos alcanos

2.2. Caracterização dos extratos de hexano das partes aéreas de *S. ramosissima*, por GC-MS:

A caracterização da fração lipofílica das partes aéreas de *S. ramosissima*, por GC-MS, teve como objetivo a identificação e quantificação dos compostos alifáticos mais voláteis extratáveis com hexano, existentes nesta planta. Propôs-se também determinar a influência da quantidade de água utilizada na irrigação no teor deste tipo de compostos. Como tal, foram necessárias duas amostras de planta, uma que cresceu em condições de irrigação normais (**NE**) e outra que cresceu com irrigação extra, ditas condições encharcadas (**E**). O extrato de hexano de cada uma das amostras foi obtido como o descrito na parte experimental (ver ponto 4).

Alíquotas dos extratos de hexano de plantas crescidas em condições **NE** e **E**, após hidrólise alcalina (realizada para clivar os ésteres presentes), e sililação dos compostos obtidos (para converter grupos hidroxilo nos respectivos derivados trimetilsililados) foram analisadas, por GC-MS. Alíquotas dos extratos não submetidas a hidrólise foram também analisadas nas mesmas condições após sililação. A análise dos extratos sem hidrólise e após hidrólise permitiu determinar quais os compostos presentes na forma livre e na forma esterificada e em que teor.

O extrato de hexano das partes aéreas de *S. ramosissima* que cresceu com irrigação natural (**NE**), representa cerca de 0,42% da massa da planta seca, com base no teor de matéria seca, e o extrato de hexano de *S. ramosissima* que cresceu sujeita a irrigação extra (**E**) representa cerca de 0,40%. Verifica-se assim que as distintas condições de irrigação não afetam significativamente o teor total de substâncias lipofílicas extratáveis com hexano. Os rendimentos de extração com hexano das partes aéreas de espécies do mesmo género são variáveis (0,42% a 2,2%).^[40,84,105] Por exemplo, *S. bigelovii*, é a espécie que apresenta o valor de rendimento de extração com hexano mais concordante com o valor obtido (0,42%).^[40] Por outro lado, os rendimentos de extração com hexano a partir de sementes são significativamente mais elevados do que aqueles que utilizam as partes aéreas.^[133]

A análise dos extratos de hexano das amostras **NE** e **E** por GC-MS resultaram na obtenção de cromatogramas complexos (com mais de 50 picos). Um cromatograma tipo é apresentado na figura 37, correspondente à amostra do extrato de hexano de **NE** após hidrólise e sililação (**NE-H**). Os compostos detetados foram numerados de acordo com o seu tempo de retenção, não sendo indicados todos os números para simplificar a figura.

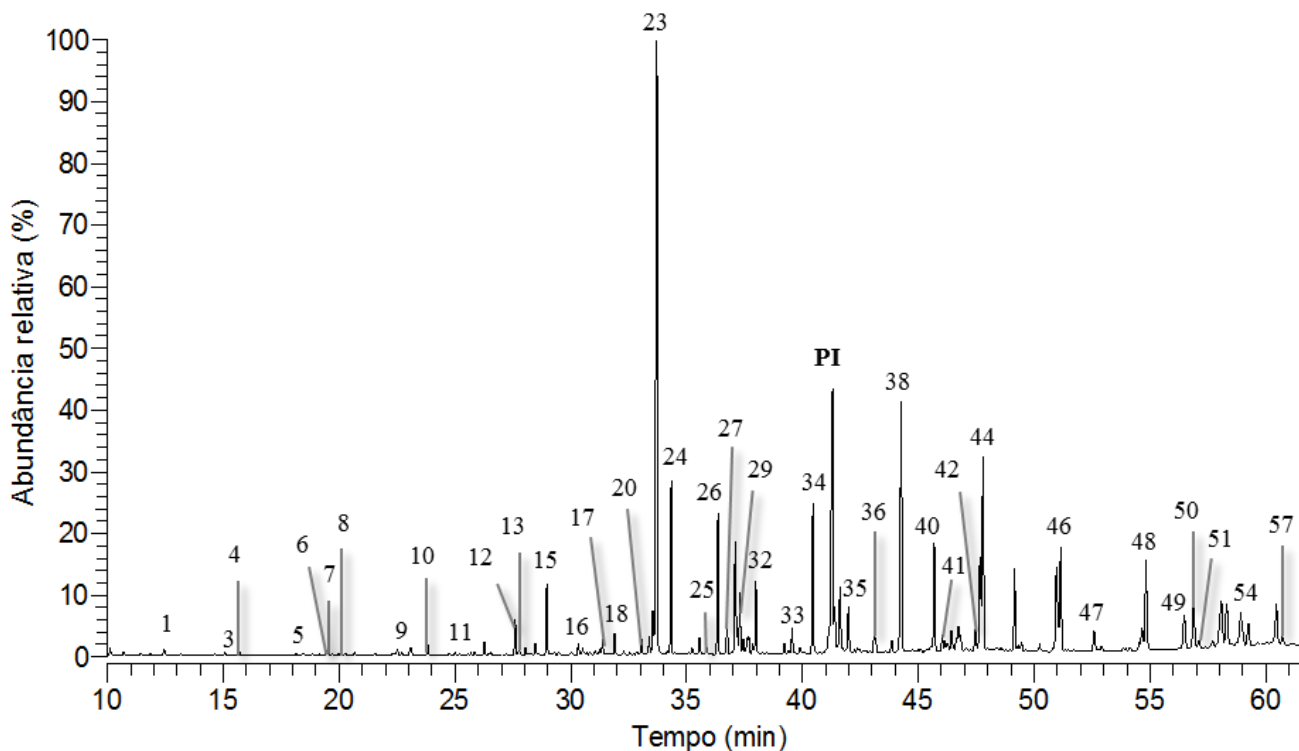


Figura 37 – Cromatograma obtido na análise por GC-MS do extrato de hexano de *S. ramosissima* NE-H

A tabela seguinte (tabela 1) contém a identificação dos compostos detetados e as respectivas abundâncias (mg de composto/100 mg de extrato), calculadas com base no fator de resposta e massa de extrato utilizada. Os compostos estão agrupados por famílias, podendo localizar-se a sua posição no cromatograma pelo respetivo número atribuído a cada composto e tempo de retenção.

Tabela 1 – Compostos identificados por GC-MS e respectivas abundâncias relativas.

Pico RT Compostos identificados					mg/100mg extrato				
					NE	NE-H	E	E-H	
Ácidos Gordos	Saturados	3	15,1	Ácido nonanóico	C9:0	0,04	0,02	0,03	0,04
		4	15,7	Ácido 2-hidroxi-heptanóico	HOOCCH(OH)(CH ₂) ₄ CH ₃	0	0,03	0	0,04
		5	18,1	Ácido decanóico	C10:0	0,03	0,02	0,02	0,06
		10	23,8	Ácido láurico	C12:0	0,04	0,06	0,03	0,09
		15	29,0	Ácido mirístico	C14:0	0,19	0,37	0,29	0,54
		17	31,4	Ácido pentadecanóico	C15:0	0,03	0,09	0,07	0,11
		23	33,7	Ácido palmítico	C16:0	2,54	3,98	3,36	5,27
		25	35,9	Ácido heptadecanóico	C17:0	0,05	0,06	0,05	0,11
		32	38,0	Ácido esteárico	C18:0	0,21	0,45	0,32	0,63
		35	42,0	Ácido eicosanóico	C20:0	0,22	0,29	0,25	0,47
		37	43,9	Ácido henicosanóico	C21:0	0,09	0,12	0,07	0,25
		40	45,7	Ácido docosanóico	C22:0	0,56	0,71	0,63	1,12
		42	47,4	Ácido triacosanóico	C23:0	0,29*	0,23	0,30*	0,32
		44	49,2	Ácido tetracosanóico	C24:0	0,63	0,76	0,55	0,94
		47	52,6	Ácido hexacosanóico	C26:0	0,40	0,23	0,22	0,37
		49	56,5	Ácido octacosanóico	C28:0	0,92	0,40	0,46	0,76
		57	60,7	Ácido triacontanóico	C30:0	0,33	0,15	0,20	0,24
	Insaturados	20	33,0	Ácido palmitelaídico	C16:1 (9E)	0,04	0,11	0,15	0,20
		21	33,4	Ácido palmitoleico	C16:1 (9Z)	0,08	0,09	0,07	0,18
		28	37,1	Ácido linoleico	C18:2 (9Z,12Z)	0,26	0,56	0,37	0,74
		29	37,2	Ácido linolénico	C18:3 (9Z,12Z,15Z)	0,11	0,12	0,12	0,23
		30	37,3	Ácido octadec-11-enóico	C18:1 (11E)	0,15	0,31	0,18	0,46
		31	37,5	Ácido oleico	C18:1 (9Z)	0,05	0,10	0,12	0,17
	Diácidos	2	13,5	Ácido sucínico	HOOC(CH ₂) ₂ COOH	0,03	0	0,02	0
		7	19,7	Ácido málico	HOOCCH(OH)CH ₂ COOH	0,07	0,02	0,04	0,06
		11	25,0	Ácido subérico	HOOC(CH ₂) ₆ COOH	0,10	0,20	0,09	0,32
		12	27,6	Ácido azelaico	HOOC(CH ₂) ₇ COOH	0,10	0,26	0,09	0,40
Álcoois	1	13,1	Glicerol		0,04	0,01	0,02	0,09	
	9	22,5	Tridecan-2-ol		0	0,04	0	0,08	
	13	27,8	Pentadecan-2-ol		0,08	0,07	0,05	0,08	
	18	31,9	Hexadecanol		0,02	0,22	0,10	0,18	
	19	32,4	Heptadecan-2-ol		0,03	0,02	0,03	0,02	
	22	33,5	Heptadecanol		0,02	0,29	0,09	0,23	
	26	36,3	Octadecanol		0,13	0,65	0,27	0,62	
	27	36,8	Fitol		0,04	0,20	0,03	0,21	
	34	40,5	Eicosanol		0,43	1,16	0,78	1,31	
	38	44,3	Docosanol		1,55	2,02	1,80	2,55	
	41	46,0	Triacosanol		0,17	0,19	0,13	0,24	
	43	47,8	Tetracosanol		2,50	1,74	2,29	2,63	
	45	49,4	Pentacosanol		0	0	0,17	0,16	
	46	51,2	Hexacosanol		1,45	0,84	1,20	1,36	
	48	54,8	Octacosanol		1,94	1,00	1,49	1,57	
	54	58,9	Triacontanol		1,12	0,63	0,73	1,08	
Esteróis	50	56,9	Estigmasterol		0,78	0,45	0,67	0,74	
	51	57,1	25-Etil-δ(22)-coprostenol		0,22	0,13	0,17	0,20	
	52	58,1	β-sitosterol		0,66	0,58	0,71	0,91	
	53	58,3	Sitostanol		0,46	0,48	0,55	0,70	
	55	59,2	Estigamast-7-en-3-ol		0,34	0,27	0,33	0,43	
Compostos aromáticos	6	19,5	Vanilina		0,03	0,02	0,03	0,03	
	8	20,0	Ácido cinâmico		0,01	0,01	0,01	0,02	
	16	30,3	Ácido ferúlico		0	0,03	0	0,02	
	24	34,3	Ácido isoferúlico		0	0,38	0	0,18	
Alcanos	33	39,2	Tricosano		0,22	0,21	0,24	0,34	
	36	43,2	Pentacosano		0,25	0,24	0,33	0,47	
Outros	14	28,5	6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona		0,23	0,18	0,22	0,29	
	39	45,1	Glicerol 1-monopalmitato		0,14	0	0,33	0	
	56	60,5	Triterpeno não identificado		0,60	0,49	0,65	0,88	

* Picos mal resolvidos. O composto identificado não estava puro.

Os compostos descritos na tabela 1 foram identificados pelo seu espectro de massa tendo em conta as fragmentações típicas de cada família, descritas no ponto 2.1., recorrendo a espectros de massa de derivados TMS de compostos padrão, bases de dados na literatura^[125-132,134,135] e espectros da biblioteca do próprio aparelho (NIST'05) No entanto, a identificação de alguns compostos não foi inequívoca.

O triterpeno **P.56** (pico **56**) é o exemplo de um composto cuja identificação não foi inequívoca. Os fragmentos identificados no espectro de massa correspondem às perdas típicas quer de esteróis^[130-132] quer de triterpenos,^[136] portanto o composto pode pertencer a qualquer uma destas famílias. O estudo foi complementado com pesquisa em bases de dados,^[127,134] o que permitiu determinar que o padrão de fragmentação é em tudo semelhante ao triterpeno cicloartenol-TMS (na figura 38).^[137]

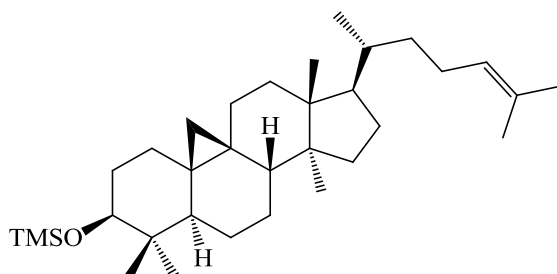


Figura 38 – Estrutura do cicloartenol-TMS

A discrepância entre o espectro de massa do composto **P.56** e o do cicloartenol-TMS tem que ver com o valor de m/z dos picos mais abundantes. O composto **P.56** apresenta fragmentos característicos com m/z superior em 14 unidades aos do cicloartenol-TMS, portanto concluiu-se que o composto **P.56** possui um CH_2 a mais que o cicloartenol-TMS. A dificuldade na identificação deste composto foi a determinação da localização do CH_2 extra. Existem três possibilidades plausíveis, os compostos **P.56a**, **P.56b** e **P.56c**, cujas estruturas são apresentadas na figura 39. No entanto, não foram encontrados espectros de massa destes derivados TMS nas bases de dados e bibliografia para comparação, impossibilitando concluir qual dos compostos se encontra presente no extrato de hexano da *S. ramosissima*.

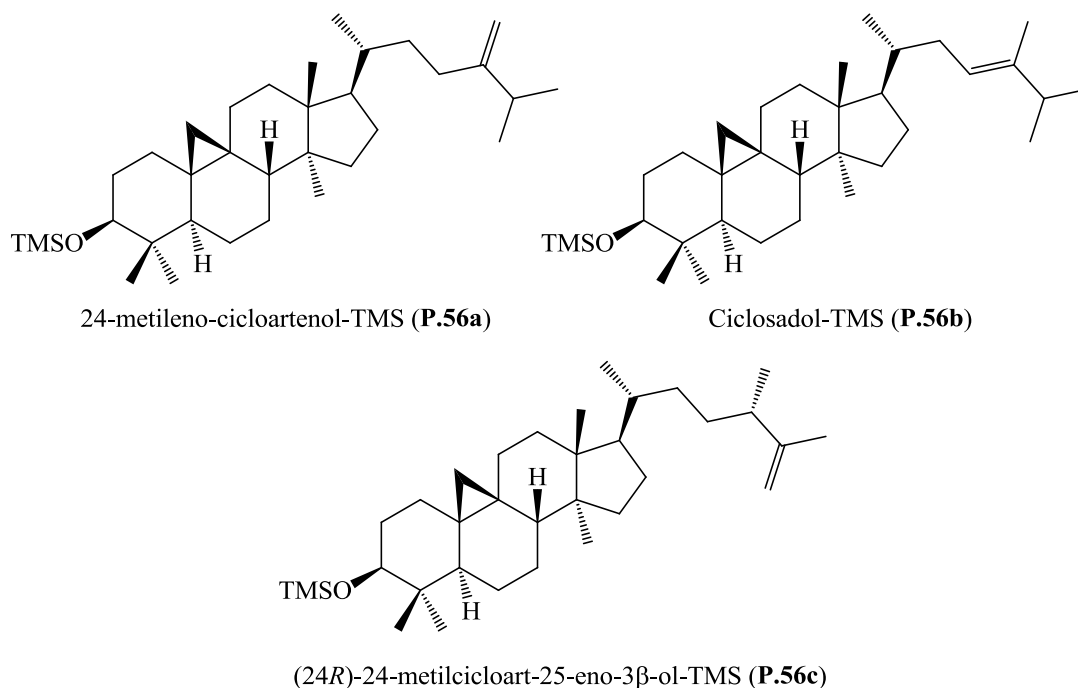


Figura 39 – Possíveis estruturas do triterpeno não identificado (P.56)

Todos os compostos identificados e quantificados por GC-MS nos extratos de hexano de **NE** e **E** das partes aéreas de *S. ramosissima* neste trabalho foram identificados pela primeira vez nesta espécie, com exceção do ácido ferúlico que foi identificado anteriormente por Renard *et al.*^[96]

A massa total de compostos identificados em relação à massa de extrato analisada foi de 21-32%. Como se pode verificar, aproximadamente 70% de cada amostra corresponde a compostos não identificáveis por GC-MS. Embora este valor seja bastante elevado, isto tem que ver com a própria natureza da planta em estudo. As plantas contêm na sua parede celular ceras, suberina e cutina, os quais são compostos bastante apolares.^[138] Contudo, estes compostos não são analisáveis por CG-MS. *S. ramosissima* terá certamente na sua composição uma maior quantidade destes componentes celulares que outras espécies. Se existirem em elevadas quantidades, contribuirão bastante para a percentagem de compostos não analisáveis encontrada. Existem também outras plantas que foram analisadas nas mesmas condições experimentais que *S. ramosissima* e apresentaram teor de compostos identificados semelhantes a esta halófita, por exemplo, várias espécies de *Eucalyptus* (*E. globulus*, *E. urograndis*, *E. grandis*, *E. maidenii* e *E. nitens*)^[139,140] e a planta *Miscanthus x giganteus*.^[141]

O gráfico que se segue (figura 40) ilustra as famílias de compostos identificadas e as respectivas abundâncias em relação ao total de compostos identificados, em cada amostra, antes e após hidrólise alcalina.

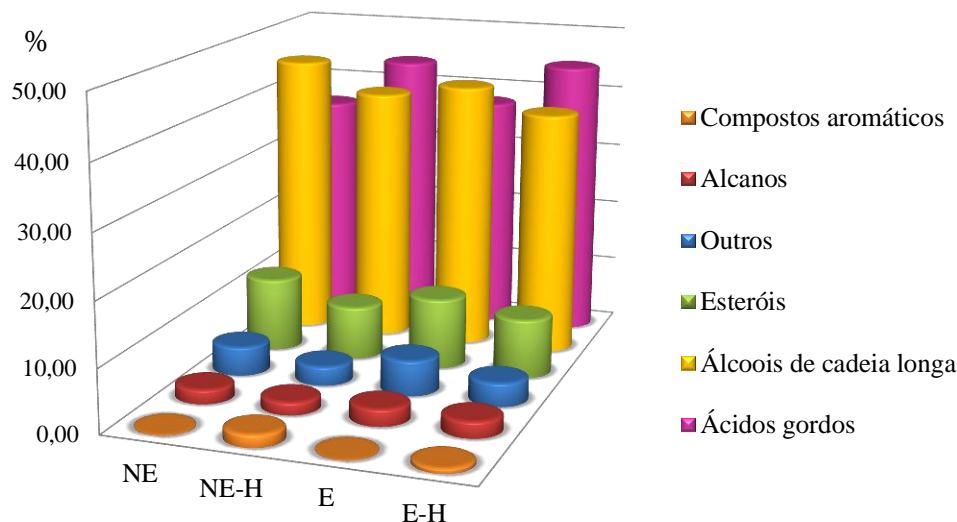


Figura 40 – Gráfico representativo das famílias de compostos identificados nos diferentes extratos (abundância em relação ao total de compostos identificado em cada amostra)

A observação do gráfico da figura 40 permite concluir quais as famílias mais abundantes nas várias amostras analisadas. Os álcoois constituem a família de compostos mais abundantes nas amostras não hidrolisadas. Após a hidrólise, esta situação altera-se, uma vez que os ácidos gordos tornam-se a família maioritária. Os esteróis figuram como a terceira família mais abundante.

As classes minoritárias abrangem os compostos aromáticos e os alcanos. As outras classes de compostos identificados são uma cetona, um monoglicerídeo e um triterpeno, incluídos na categoria “outros”. De acordo com as abundâncias pouco significativas das classes minoritárias, apenas as três primeiras famílias (álcoois, ácidos e esteróis) foram analisadas em maior detalhe.

Os esteróis representam 1,9 a 3,0% dos extratos analisados (NE, NE-H, E, E-H). Isto corresponde a 8,5-11,8% do teor total de compostos identificados. Foram identificados 5 esteróis nesta espécie de *Salicornia*, onde os mais abundantes são o estigmasterol e o β -sitosterol, correspondendo cada um a cerca de 27-28% conteúdo total de esteróis identificados. O estigmasterol é um esterol bastante comum no género *Salicornia*. Pode ser encontrado nas espécies *S. europaea*, *S. bigelovii*,^[104] *S. fruticosa*^[105] e *S. herbacea*.^[106,114]

Também o β -sitosterol ocorre naturalmente em *S. herbacea*.^[106] El-Mallah *et al.*^[66] reportam que o estigamast-7-en-3-ol é o esterol mais abundante nas sementes da variedade híbrida SOS-7, seguido pelo sitosterol. Relativamente aos restantes esteróis identificados e quantificados, nomeadamente, o 25-etil- δ (22)-coprostenol e o sitostanol, é a primeira vez que são reportados no género *Salicornia*.

Os álcoois constituem uma classe de compostos que contabiliza 9,1 a 12,4% do extrato, o que corresponde a 39,1-45,2% do teor total de compostos identificados. Os principais álcoois identificados nas amostras são álcoois de cadeia linear longa. O álcool maioritário é o tetracosanol (C_{24} -OH), representando cerca de 7,8-11,9% do teor de compostos identificados. Este é também o segundo composto mais abundante identificado nos extratos (1,7-2,6% dos extratos analisados). Seguem-se o docosanol (C_{22} -OH) e o octacosanol (C_{28} -OH), cujas abundâncias correspondem respetivamente 7,4-9,0% e 4,5-9,2%, do teor de compostos identificados. Apenas para as espécies *S. herbacea*^[114] e *S. fruticosa*^[105] existem dados na literatura relativos à presença de álcoois. O fitol foi isolado anteriormente em *S. herbacea*.^[114] Contudo, os álcoois identificados neste trabalho (desde C_{13} -OH a C_{30} -OH) são álcoois de menor peso molecular que os identificados em *S. fruticosa* (desde C_{30} -OH a C_{38} -OH).^[105] Por outro lado, foram identificados três álcoois secundários, nomeadamente, tridecan-2-ol, pentadecan-2-ol e heptadecan-2-ol e não há registo da ocorrência deste tipo de álcoois no género *Salicornia*.

Os ácidos gordos correspondem a 7,6-14,1% do extrato, ou seja, uma abundância de 35,9 a 44,5% do teor de compostos identificados nos extratos. Estes compostos constituem a classe com maior número e diversidade estrutural de compostos identificados. Por este motivo, fazem parte desta família 4 subclasses, nomeadamente, ácidos gordos saturados, mono-insaturados, poli-insaturados e diácidos. As abundâncias relativas destas 4 subclasses, em relação ao total de ácidos gordos identificados, podem ser avaliadas na figura 41.

O conteúdo de ácidos gordos da *S. ramosissima* é dominado pelos ácidos gordos saturados. Estes constituem cerca de 80,5-86,8% do teor de ácidos identificados. Nesta subclasse destacam-se os ácidos de cadeia longa: ácidos palmítico ($C_{16:0}$), tetracosanóico ($C_{24:0}$) e docosanóico ($C_{22:0}$), como os mais abundantes. O ácido maioritário é o palmítico (33,6 a 41,5% do teor total de ácidos gordos no extrato), sendo também o composto mais abundante identificado nos extratos (2,5-5,3% do extrato). Os ácidos tetracosanóico e

docosanóico são bastante abundantes, respetivamente 6,7-8,4% e 7,3-7,9% do teor total de ácidos gordos identificados nas amostras analisadas. O perfil lipídico das espécies de *Salicornia* é bastante variável, contudo, o perfil de ácidos gordos determinado para a *S. ramosissima* é semelhante ao de *S. fruticosa* (atualmente classificada como *Sarcocornia fruticosa*): o perfil lipídico de *S. fruticosa* é dominado por ácidos gordos saturados e o composto maioritário é o ácido palmítico, correspondendo a 32,4% do conteúdo total de ácidos identificados.^[105]

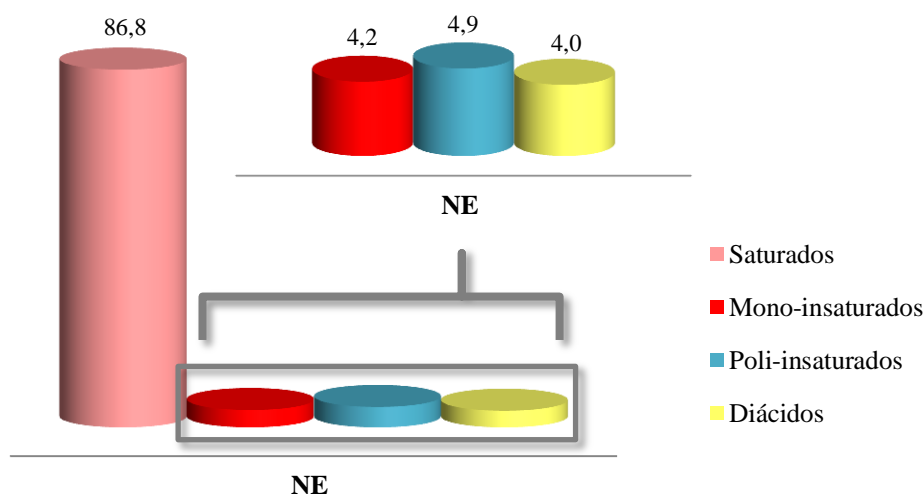


Figura 41 – Gráfico representativo das abundâncias das subclasses de ácidos gordos em relação ao total de ácidos gordos identificados, para a amostra NE

As subclasses dos ácidos mono- e poli-insaturados apresentam abundâncias pouco significativas, na ordem dos 4,2-7,1% e 5,0-7,0% respetivamente, em relação ao teor total de ácidos identificados. A subclasse dos ácidos poli-insaturados compreende apenas dois ácidos, os ácidos linoleico ($C_{18:2}$ (9Z, 12Z)) e linolénico ($C_{18:3}$ (9Z, 12Z, 15Z)). O ácido linoleico é o ácido insaturado mais abundante identificado nos extratos, (3,5-5,8% do teor total de ácidos identificados). Os ácidos linoleico e linolénico são frequentes noutras espécies de *Salicornia*, em quantidades mais significativas. Por exemplo, no caso da *S. herbacea*, Essaidi *et al.*^[84] determinaram que os ácidos linoleico e linolénico são os ácidos maioritários, correspondendo a 62% do extrato. Na espécie *S. europaea* o ácido α -linolénico corresponde ao composto mais abundante identificado.^[103]

Os ácidos mono-insaturados apresentam abundâncias relativamente baixas e bastante semelhantes entre si, destaca-se apenas o ácido octadec-11-enóico como o

composto mais abundante desta subclasse correspondendo a 1,9-3,2% do teor total de ácidos identificados. Está reportada na literatura a presença de ácidos mono-insaturados no género *Salicornia*. O ácido oleico é bastante comum neste género, podendo ser encontrado em *S. europaea*,^[103] *S. fruticosa*,^[105] *S. herbacea*^[84] e também nas sementes de *S. brachiata*.^[60] Também o palmitoleico pode ser encontrado em *S. herbacea*.^[84] Contudo, os ácidos palmitelaídico e octadec-11-enóico não foram descritos anteriormente no género *Salicornia*.

A subclasse dos diácidos representa a minoria dos ácidos identificados, com uma abundância de 2,9 a 5,5% do conteúdo total de ácidos identificados. Foram identificados 4 compostos deste tipo nesta espécie, onde os mais abundantes são os ácidos subérico ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$) (1,3-2,3%) e azelaíco ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) (1,3-2,8%). Até ao momento não existem evidências bibliográficas da ocorrência deste género de ácidos no género *Salicornia*. O ácido málico ($\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$) para além da função de diácido apresenta também um grupo hidroxilo como substituinte, sendo portanto um hidroxidiácido. Foi ainda identificado e quantificado um hidroxiaácido saturado, o ácido 2-hidrox-heptanoíco ($\text{HOOCCH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$). Também é a primeira vez que é reportada a existência de hidroxiaácidos no género *Salicornia*.

A análise dos extratos antes e após hidrólise alcalina (**NE** versus **NE-H** e **E** versus **E-H**) permitiu concluir que o teor de compostos esterificados (1,3-10,2% do extrato) é inferior ao teor de compostos na forma livres (~ 21% do extrato).

Das classes de compostos identificados, apenas as classes dos ácidos gordos e a dos compostos aromáticos são significativamente afetadas pela realização da hidrólise. Uma vez que a abundância dos ácidos é muito mais significativa que a dos compostos aromáticos, e os primeiros aumentam significativamente após a hidrólise (observável no gráfico da figura 40) conclui-se que dos compostos identificados, os ácidos gordos representam a família mais envolvida em ésteres hidrolisáveis. De facto, 2,2 a 6,0% dos extratos são ácidos na forma esterificada. Apenas 0,4 a 0,2% dos extratos corresponde a compostos aromáticos esterificados e estes valores devem-se aos ácidos ferúlico e isoferúlico que ocorrem exclusivamente na forma esterificada.

Os ácidos gordos palmítico, linoleico, linolénico, esteárico, docosanóico, mirístico, subérico e azelaíco destacam-se como os ácidos que apresentam um maior aumento após a hidrólise alcalina. O ácido 2-hidrox-heptanoíco é o único ácido e o que ocorre

exclusivamente sob a forma de éster. Outros compostos que ocorrem exclusivamente esterificados incluem os ácidos ferúlico, isoferúlico, já referidos, e o álcool tridecan-2-ol. Contudo nada se pode concluir acerca de que ésteres se tratam uma vez que antes da hidrólise apenas foi detetado um éster (glicerol-1-monopalmitato). A deteção dos ésteres está condicionada ao peso molecular dos mesmos e à sua baixa volatilidade. Em alguns casos, o peso molecular dos ésteres excede o limite de deteção do aparelho (750 u.m.a), impossibilitando a deteção dos mesmos.

O glicerol 1-monopalmitato é clivado em consequência da hidrólise alcalina. Na amostra hidrolisada é de esperar a presença, em maior quantidade, do glicerol e do ácido palmítico, em comparação com a amostra que não sofreu hidrólise. No entanto, no caso do glicerol isto não se verifica, facto que pode ser explicado pela sua maior afinidade para a fase aquosa durante a extração líquido/líquido com diclorometano. A abundância relativa do ácido palmítico aumenta consideravelmente após a hidrólise alcalina. Contudo, a contribuição resultante da clivagem do glicerol 1-monopalmitato é bastante reduzida, quando comparada com o aumento do teor do ácido palmítico. Isto significa que o ácido palmítico também se encontra esterificado com outros compostos, não só com o glicerol. Novamente, nada se pode concluir acerca de quais os compostos esterificados com o ácido palmítico.

O teor do ácido tricosanóico mereceu uma análise cuidada. Nos cromatogramas das amostras não hidrolisadas, o pico referente a este composto apresentava uma contaminação, talvez por restos de compostos retidos na coluna ou compostos minoritários provenientes do extrato. De acordo com isto, a percentagem calculada para este composto não é a real, dado que não é possível deduzir qual a quantidade de contaminante presente. Uma vez que após hidrólise alcalina o contaminante desaparece e não há variação significativa no teor de ácido tricosanóico antes e após hidrólise, pode-se concluir que existe algum teor de ácido tricosanóico na forma esterificada, praticamente o equivalente ao teor do contaminante, embora não se possa concluir qual o teor de composto na forma esterificada.

O ácido sucínico não é detetado após hidrólise alcalina, no entanto, este não sofre qualquer reação durante a hidrólise alcalina. Dada a sua estrutura, com dois grupos carboxílicos e um reduzido número de CH₂, é um composto significativamente polar. No

processo de extração após a hidrólise alcalina exibe maior afinidade para a fase aquosa, não sendo extraído com o diclorometano, do mesmo modo que o glicerol.

A análise do extrato de hexano da *S. ramosissima* que cresceu em duas condições de irrigação distintas (irrigação natural (**NE**) e a irrigação em excesso (**E**)) teve como objetivo determinar se a água de irrigação influencia significativamente o perfil lipídico da *S. ramosissima*. Portanto, pretendia-se avaliar se existiam e quais as alterações nos compostos e famílias de compostos mais abundantes, bem como variações na produção de compostos esterificados, produção de novos compostos e/ou supressão de produção de compostos identificados.

O perfil lipídico dos extratos de hexano **NE** e **E** é bastante semelhante. O composto mais abundante identificado no extrato de hexano **E** corresponde ao ácido palmítico, seguido pelo tetracosano, antes e após hidrólise alcalina, tal como o verificado para **NE**. As famílias de compostos identificados são as mesmas em ambos os extratos e as respectivas abundâncias são semelhantes, sendo que os álcoois correspondem à família mais abundante antes da hidrólise alcalina e os ácidos à mais abundante após hidrólise. Todas as famílias englobam os mesmos compostos identificados para **NE**, com exceção do álcool pentacosanol ($C_{25}\text{-OH}$). Este composto foi detetado exclusivamente nas amostras referentes ao extrato **E**, portanto, apenas é produzido pela *S. ramosissima* em situações de irrigação excessiva.

A diferença não significativa entre o extrato de hexano da amostra **NE** e **E** é notória no gráfico apresentado na figura 42. Contudo, verifica-se que existe uma diferença significativa na produção de compostos esterificados (**NE-H** versus **E-H**).

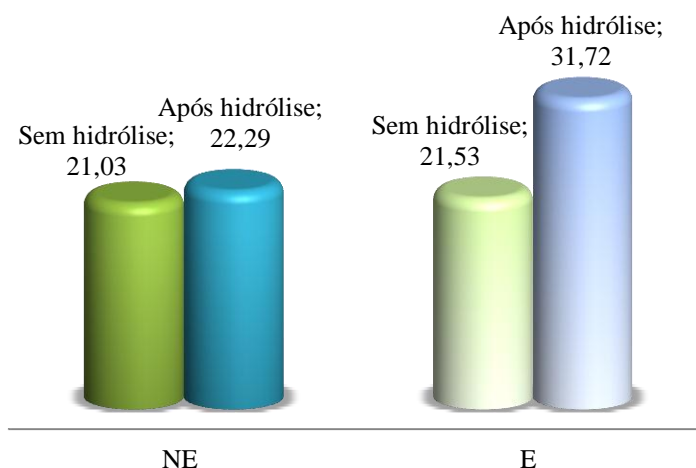


Figura 42 – Gráfico correspondente ao teor total (%) de compostos identificados nos extratos de hexano NE e E

O acréscimo substancial de compostos detetados no extrato **E** após hidrólise alcalina (**E-H**) (10,2%) revela que a produção de compostos alifáticos na forma esterificada hidrolisáveis com KOH é maior na *S. ramosissima* sujeita a irrigação extra. Tal facto poderá estar relacionado com o reforço das paredes celulares e/ou impermeabilização da superfície exterior da planta de forma a equilibrar a pressão osmótica.^[138,142]

O acréscimo no teor de compostos originalmente esterificados observado no extrato de hexano de *S. ramosissima* **E-H** (figura 43) nota-se sobretudo no maior teor de ácidos gordos e álcoois detetados após hidrólise (74% e 35%, respetivamente). Os aumentos observados sugerem que o incremento no teor de compostos esterificados não se deve apenas a ésteres entre ácidos gordos e álcoois de cadeia longa. Por outro lado, os esteróis não aumentam significativamente da amostra **E** para a **E-H** (figura 43), assim não estão esterificados com ácidos gordos. Aliás, o teor de esteróis é semelhante em todas as amostras (**NE**, **NE-H**, **E** e **E-H**), portanto, os esteróis não são afetados pela condição em estudo (irrigação extra). Posto isto, os ésteres em questão envolverão ácidos gordos e compostos com outro tipo de grupos hidroxilo, por exemplo açúcares.

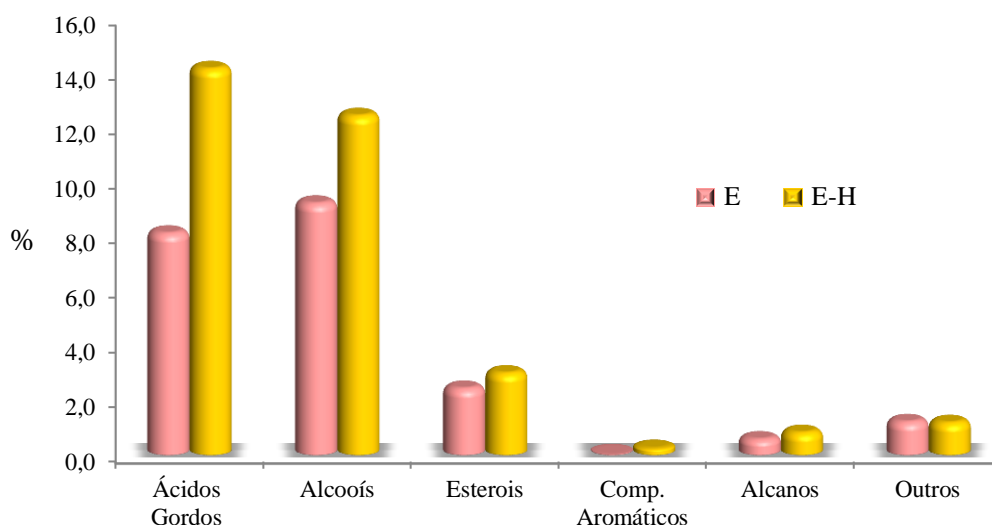


Figura 43 – Gráfico de E versus E-H. Representação da abundância das famílias de compostos identificados

Analisando as alterações no teor de cada uma das subclasses de ácidos gordos na amostra **E** antes e após hidrólise, verificou-se que são os ácidos gordos saturados aqueles que mais contribuem para o aumento do teor de ácidos gordos após hidrólise na amostra **E**. O aumento no teor de ácidos gordos deve 75% aos ácidos gordos saturados. No entanto, o teor de ácidos gordos saturados livres no extrato continua superior ao teor de ácidos gordos esterificados (6,9% contra 4,5%). O mesmo não se pode dizer dos diácidos que no extrato de hexano da amostra **E** se encontram maioritariamente na forma esterificada (0,8% na forma esterificada contra 0,2% na forma livre). Uma consequência disto é o aumento de 225% no teor de diácidos após hidrólise alcalina, observável na amostra **E-H**. Os ácidos insaturados encontram-se praticamente em proporções idênticas na forma esterificada e livre, situação idêntica à observada na amostra **NE**. Nesta subclasse a diferença está no teor de ácidos insaturados detetados na amostra **E** (1,0% livres e 2,0% esterificados), que é superior ao detetado na **NE** (0,7% livres e 1,3% esterificados).

Assim, concluiu-se que a irrigação extra provoca a formação de maior quantidade de compostos alifáticos na forma de ésteres hidrolisáveis com KOH. Os ésteres formados envolvem sobretudo ácidos gordos saturados e álcoois de cadeia longa, mas não só. Os resultados sugerem que podem estar envolvidos ésteres entre ácidos gordos e açúcares. A irrigação extra também parece provocar um aumento significativo no teor de diácidos, sendo que estes se apresentam então quase exclusivamente na forma de ésteres.

3. Análise do extrato de diclorometano das partes aéreas de *S. ramosissima*

Os compostos descritos neste ponto foram todos isolados, por cromatografia preparativa em coluna (CC) e em camada fina (tlc), a partir do extrato de diclorometano das partes aéreas de *S. ramosissima*. Os detalhes das respectivas separações cromatográficas podem ser consultados no esquema da figura 78 (ponto 4).

Os compostos isolados foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e por espectrometria de massa (EM). O RMN e a EM são duas técnicas espectroscópicas extremamente úteis no âmbito deste trabalho, uma vez que são duas das plataformas analíticas mais apelativas na análise e identificação de metabolitos.^[122,123]

A espectroscopia de RMN tem como objetivo a identificação inequívoca de compostos orgânicos, através de informação espectral, com aplicações a uma larga variedade de compostos e alcance na ordem dos μmol .^[122] A EM apresenta elevada seletividade e sensibilidade na identificação de metabolitos e cobre uma grande diversidade de compostos. Permite a combinação com técnicas de separação avançadas e altamente eficientes, reduzindo a complexidade da separação de metabolitos.^[123]

A análise por RMN, nomeadamente, os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, DEPT, HSQC e HMBC obtidos, permitiram a determinação das estruturas corretas de cada composto isolado. A espectrometria de massa permitiu a confirmação das estruturas determinadas, por comparação dos pesos moleculares dos compostos com o dos respetivos iões moleculares.

3.1. Caraterização estrutural do composto A

A análise cuidada dos espectros de RMN do composto A mostrou a presença de alguns sinais de ressonância característicos de uma estrutura contendo um sistema vinílico ligado a um anel aromático. Como sejam:

- Dois sinais, em forma de duplete surgindo a desvios químicos muito diferentes, δ_H 8,09 e 6,43 ppm (figura 44). A constante de acoplamento, $J = 16,0$ Hz. Com estes dados é possível afirmar que os sinais correspondem à ressonância de dois prótons vinílicos, em configuração *trans*. No espectro de HSQC (figura 45) verifica-se que estes prótons exibem correlação com os carbonos correspondentes aos sinais a δ_C 140,4 e 120,9 ppm, respetivamente. Estes valores de frequência em RMN de ^{13}C são caraterísticos de carbonos vinílicos.

- Na zona do espectro de RMN de 1H característica da ressonância de prótons aromáticos surgem quatro sinais a δ_H 7,62 (*dd*, $J = 2,0$ e $7,5$ Hz), 7,42 (*dd*, $J = 1,6$ e $7,8$ Hz), 7,31 (*m*) e 7,29 ppm (*m*), cada um com integral proporcional a 1 próton. Este número de sinais e multiplicidade dos mesmos possibilitou a identificação inequívoca de um anel aromático dissubstituído.

- Para valores de campo maiores são evidentes dois sinais, um a δ_H 1,35 ppm (*t*, 3H, $J = 7,1$ Hz), e o outro a 4,28 ppm (*q*, 2H, $J = 7,1$ Hz), que acoplam entre si, portanto está presente um grupo etilo na molécula. Note-se que o desvio químico correspondente a δ_H 4,28 ppm é bastante elevado para prótons de um grupo CH_2 numa cadeia carbonada, o que sugere que este estabelece uma ligação com um átomo fortemente eletronegativo, como por exemplo um átomo de oxigénio. Além disso, o sinal correspondente ao carbono a δ_C 60,7 ppm também é caraterístico de um carbono ligado a um átomo de oxigénio.

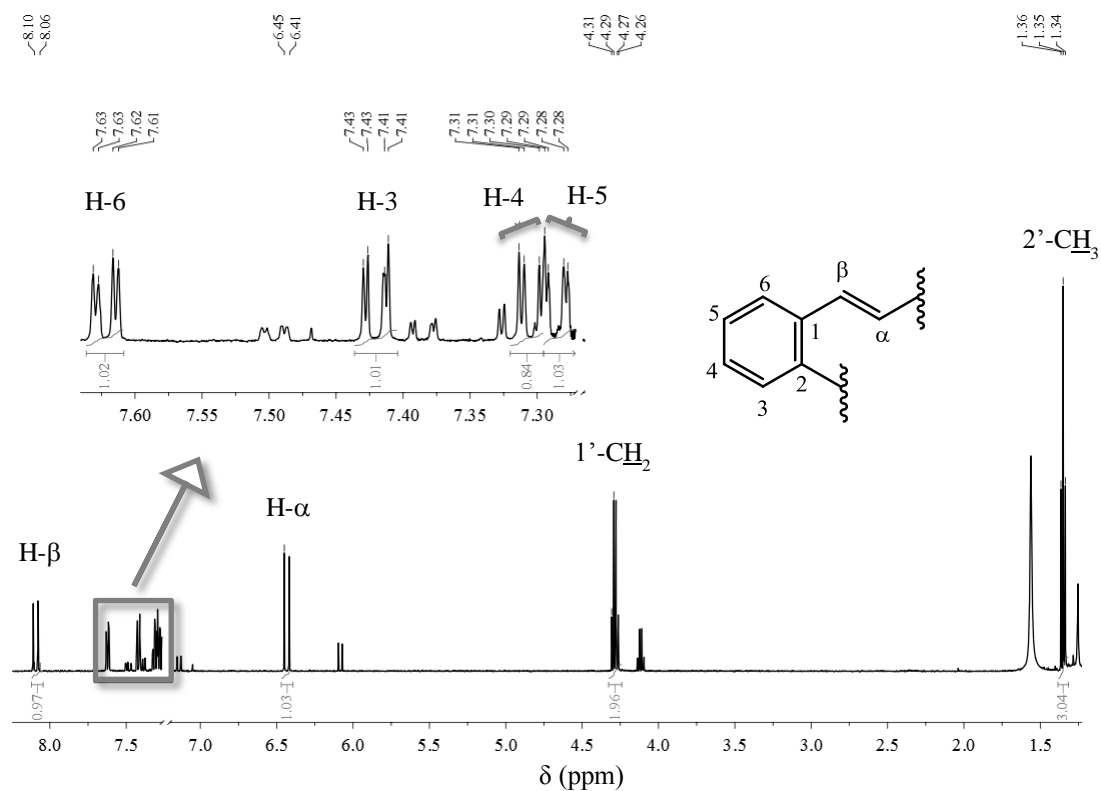
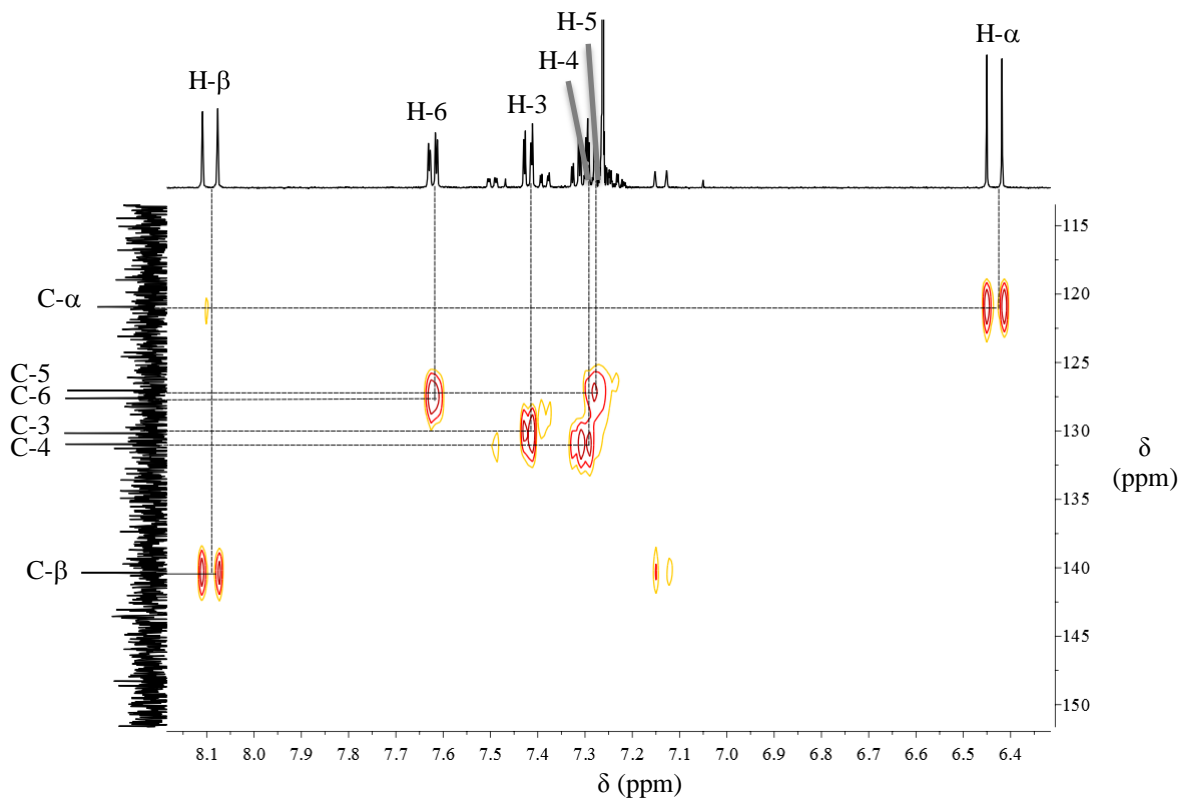
Figura 44 – Espetro de RMN de ¹H do composto A

Figura 45 – Ampliação do espectro de HSQC do composto A

O composto A também contém na sua estrutura um carbono carbonílico. Este facto é justificado por um sinal a δ_C 166,5 ppm no espetro de RMN de ^{13}C . Desvios químicos desta amplitude são característicos da ressonância de carbonos carbonílicos, mais concretamente, em grupos alcóxicarbonilos. As conexões encontradas no espetro bidimensional HMBC (figura 46a) demonstram que os prótons H-1' correlacionam-se com o carbono carbonílico, portanto, concluiu-se que o composto A tem de facto um grupo etóxicarbonilo.

As restantes correlações observadas no espetro de HMBC (figura 46a) demonstram que o carbono carboxílico está ligado ao sistema vinílico e, por este motivo, o próton vinílico H- β sofre o efeito mesomérico desprotetor do grupo carbonilo, o que justifica o seu elevado desvio químico a 8,09 ppm e, conseqüentemente, o próton H- α surge a δ_H 6,43 ppm. As correlações entre H- α e C-1 (δ_C 132,8 ppm), H- β e C-2 (δ_C 134,9 ppm) (figura 46a) e H-6 e C- β (figura 46b) demonstram a ligação do anel aromático ao sistema vinílico.

A figura 46a e 46b ilustra todas as correlações observadas no espetro de HMBC do composto A.

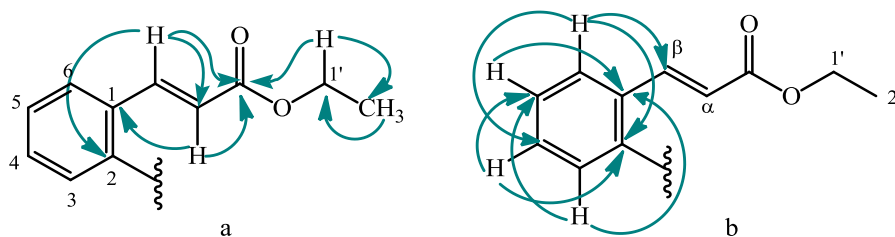


Figura 46 – Correlações a longa distância observadas no espetro de HMBC do composto A

O espetro de EM revelou um pico a m/z 215, correspondente ao ião $[M+Na]^+$. Portanto, a massa do composto A corresponde a 192 u.m.a., valor esse que corresponde à soma da massa molecular de todas as características estruturais anteriormente referidas e de um grupo hidroxilo. A estrutura molecular elucidada para o composto A está ilustrada na figura 47 e é correspondente com os dados encontrados nos espetros de RMN, salientando-se o facto de que o próton do grupo hidroxilo é lábil e por isso não é detetável no espetro de RMN de 1H .

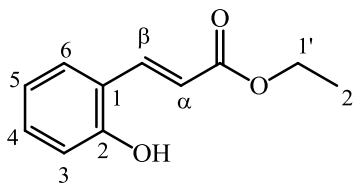


Figura 47 – Estrutura molecular do composto A

O composto isolado é um éster etílico do ácido *o*-cumárico e denomina-se frequentemente como *o*-hidroxicinamato de etilo.

O *o*-hidroxicinamato de etilo é um derivado do ácido cinâmico. O ácido cinâmico é um constituinte das plantas, com origem no metabolismo dos fenilpropanóides (via do ácido xiquímico).^[143,144] O cumarato de etilo (isômero do composto A) pode ser encontrado nos frutos da árvore *Pandanus tectorius* Soland,^[145] nas folhas da planta do pepino (*Cucumis sativus* L.)^[146] e no Champanhe (vinho espumante produzido exclusivamente a partir das uvas Pinot Noir, Pinot Meunier e Chardonnay).^[147,148]

Diversos autores^[84,107,108] reportaram a ocorrência de ácidos cinâmicos livres na espécie *S. herbacea*, incluindo o ácido *p*-cumárico.^[84] Contudo, apenas foi reportada a ocorrência de um ácido cinâmico esterificado no género *Salicornia*.^[114] O *o*-hidroxicinamato de etilo foi isolado e caracterizado pela primeira vez no género *Salicornia*, neste trabalho.

Os derivados do ácido cinâmico constituem uma classe de anticancerígenos conhecidos^[149] e, do mesmo modo, também os ésteres de cinamatos apresentam aplicações como anticancerígenos,^[150] contudo, o efeito é dependente da sua hidrofobicidade.^[151]

3.2. Caracterização estrutural do Composto B

A análise dos espectros de RMN do composto B revelou algumas semelhanças estruturais com o 2-hidroxicinamato de etilo. No espectro de ^1H do composto B (figura 48) verifica-se a existência de sinais de ressonância característicos da presença de um anel aromático ligado a um sistema vinílico. Deste modo, os sinais nos espectros de RMN do composto B que fornecem maior informação estrutural são os seguintes:

- Dois sinais em forma de duplete a δ_{H} 6,29 (*d*, 1H, $J = 15,9$ Hz) e 7,61 (*d*, 1H, $J = 15,9$ Hz) ppm que, tal como no composto A, correspondem à ressonância dos prótons H- α e H- β , respetivamente e cuja constante de acoplamento indica uma configuração *trans*. Com recurso ao espectro bidimensional HSQC, os respetivos carbonos foram assinalados a δ_{C} 115,7 e 144,6 ppm.

- Três sinais a δ_{H} 7,07 (*dd*, 1H, $J = 1,8, 8,2$ Hz), 7,03 (*d*, 1H, $J = 1,8$ Hz) e 6,91 ppm (*d*, 1H, $J = 8,2$ Hz), característicos de um anel aromático trissubstituído (nas posições 1,3 e 4). Também neste caso foi possível, pelas correlações no espectro de HSQC, assinalar os respetivos carbonos a δ_{C} 123,0, 109,2 e 114,7 ppm.

- Também está presente um grupo alcóxicarbonilo na estrutura molecular do composto B, pois o sinal a δ_{C} 167,4 ppm, que surge no espectro de RMN de ^{13}C , corresponde à ressonância do carbono carbonílico desse grupo. As conetividades dos prótons H- β e H- α (figura 49a) permitiram confirmar a ligação do sistema vinílico ao anel aromático e ao carbono carbonílico. As restantes conetividades ilustradas na figura 49a permitiram confirmar alguns assinalamentos de carbonos protonados, como C-2, C-4, C-6 e C- β e assinalar os carbonos quaternários C-1 (δ_{C} 127,0 ppm), C-3 (δ_{C} 146,7 ppm) e C-4 (δ_{C} 147,8 ppm). A confirmação destes dois últimos assinalamentos foi obtida pelas conetividades (figura 49b) dos prótons do grupo metóxilo, sinal em forma de singuleto a δ_{H} 3,93 ppm (figura 48) e do próton do grupo hidroxilo, sinal a δ_{H} 5,85 ppm (figura 48), típico de grupos hidroxilo fenólicos e sem correlação no espectro bidimensional de HSQC.

- Um sinal em forma de triplete a 0,88 ppm ($J = 6,7$ Hz), o qual corresponde à ressonância de três prótons de um grupo metilo terminal, cujo carbono correspondente (correlação no HSQC) surge a δ_{C} 14,1 ppm.

- Um sinal em forma de tripleto δ_H 4,19 ppm (2H, $J = 6,7$ Hz), correspondente à ressonância de dois prótons, cujo carbono surge a δ_C 64,6 ppm e é característico de uma ligação a um átomo de oxigénio. No espectro de HMBC foi possível identificar as conexões destes prótons (figura 49b) e verificar que se trata de um álcool, cuja cadeia alifática se estende até ao grupo metilo (δ_H 0,88 ppm e δ_C 14,1 ppm).

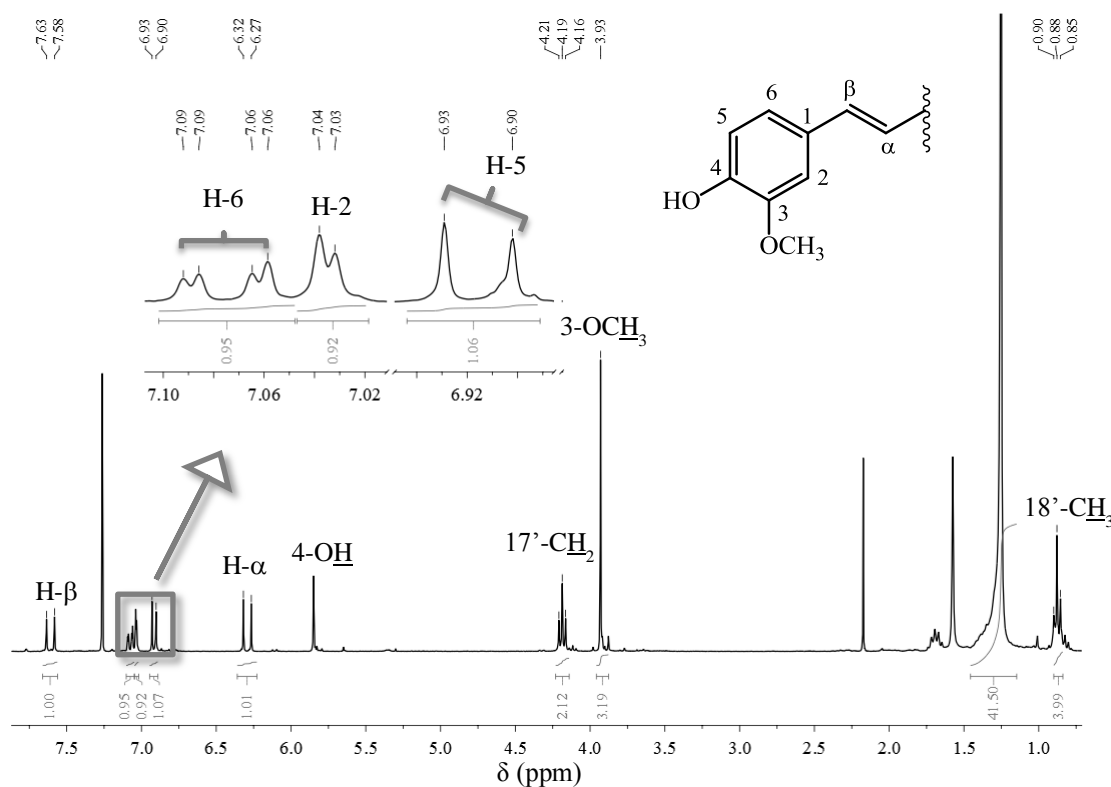


Figura 48 – Espectro de RMN de 1H do composto B

O composto determinado corresponde ao ácido (*E*)-ferúlico esterificado com um álcool de cadeia longa. Com base nos dados espectroscópicos apresentados, não foi possível determinar o número de átomos de carbono na cadeia do grupo alcóxido. Contudo, o espectro de massa de ionização por eletrospray mostrou dois picos de elevada intensidade a m/z 447 e 475, que correspondem a dois iões $[M+H]^+$ que diferem 28 u.m.a. um do outro. Portanto, a EM sugere que o composto B corresponde, afinal a uma mistura de dois compostos cuja única diferença é o número de carbonos que compõem a cadeia alifática (18 ou 20 carbonos). Este facto é reforçado pela presença de dois picos menos abundantes a m/z 915 e 971 que correspondem aos iões dos respetivos dímeros dos compostos ligados

a um átomo de sódio. Assim, o composto B não se trata de um composto puro, mas sim de uma mistura de compostos, B1 e B2, cujas estruturas podem ser consultadas na figura 50. Apesar dos compostos B1 e B2 terem sido identificados em várias frações, (figura 78, ponto 4), não foi possível obtê-los na forma pura embora em algumas frações um dos compostos fosse maioritário.

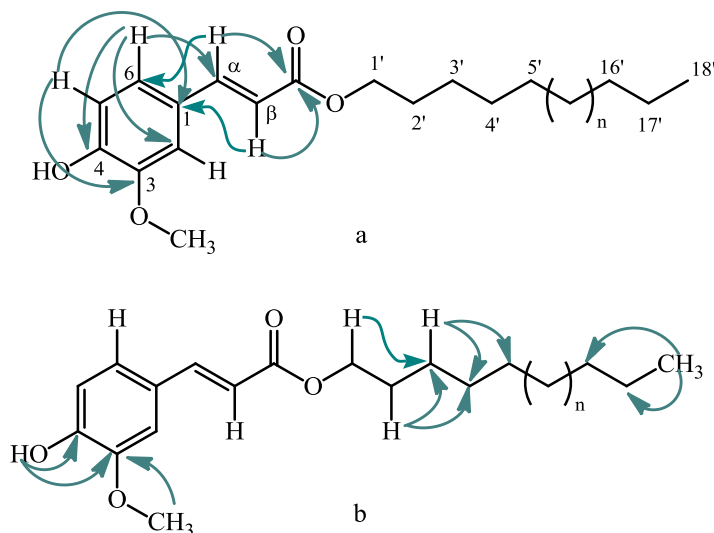


Figura 49 – Correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto B

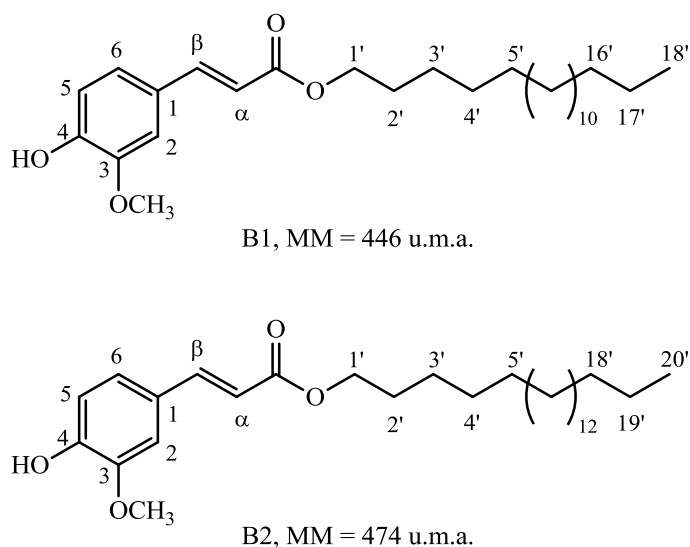


Figura 50 – Mistura de compostos B: B1 – (*E*)-ferulato de octadecanilo e B2 – (*E*)-ferulato de eicosanilo

Os compostos B1 e B2, são ambos ésteres do ácido ferúlico com álcoois de cadeia longa (C₁₈-OH e C₂₀-OH, respectivamente) e, tal como o 2-hidroxicinamato de etilo (composto A), também derivam de um ácido cinâmico, o ácido ferúlico.

Os ferulatos de alquilo B1 e B2 podem ser encontrados em raízes maduras da planta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh,^[152] na casca da mimosa (*Acacia dealbata* Link)^[153] e na batata (*Solanum tuberosum* L.).^[154]

O ácido ferúlico livre foi isolado anteriormente nas espécies *S. herbacea*,^[107,108] e *S. ramosissima*.^[96] Contudo, no género *Salicornia* apenas foi isolado o ferulato de pentadecilo, a partir da espécie *S. herbacea*.^[114] Na *S. herbacea*, o ferulato de pentadecilo é responsável por fortes atividades antioxidante e antiproliferativa,^[114] também a *S. ramosissima* poderá exercer atividades biológicas semelhantes devido à presença dos compostos B1 e B2.

3.3. Caracterização estrutural do composto C

Tal como nos compostos A, B1 e B2, também os espectros do composto C apresentam sinais de ressonância característicos da presença de um anel aromático ligado a um sistema vinílico, que por sua vez está ligado a um grupo carbonilo.

No espectro de RMN de ^{13}C surge um sinal a δ_{C} 161,7 ppm, característico de um carbono carbonílico.

No espectro de RMN de ^1H (figura 51) observam-se dois dupletos a δ_{H} 7,60 e 6,27 ppm, com constante de acoplamento de 9,5 Hz, correspondentes a um sistema vinílico com uma configuração Z. Também surgem no mesmo espectro dois sinais em forma de singuleto a δ_{H} 6,92 e 6,85 ppm característicos de prótons aromáticos em posição *para* e cujo desvio químico indica serem *orto* em relação a grupos OR. A presença de um sinal em forma de singuleto a δ_{H} 3,96 ppm indica que um desses grupos é um metóxilo. A existência de um sinal a δ_{C} 56,4 ppm no espectro de RMN de ^{13}C , que se correlaciona (no espectro de HSQC) com os prótons a δ_{H} 3,96 ppm, confirma essa hipótese. O espectro bidimensional HSQC possibilitou o assinalamento dos carbonos ligados aos prótons anteriormente referidos, como sejam os vinílicos a δ_{C} 143,3 e 113,4 ppm e os aromáticos a 103,2 e 107,5 ppm.

Com o espectro bidimensional HMBC detetou-se as conexões entre os prótons vinílicos e o carbono carbonílico (figura 52a) e simultaneamente entre o sinal do próton vinílico a δ_{H} 6,27 ppm e o carbono a δ_{C} 111,5 ppm e entre os sinais dos prótons aromáticos a δ_{H} 6,85 e 6,92 ppm e os carbonos a δ_{C} 143,3 e 111,5 ppm, respetivamente (figura 52a). Estas conexões possibilitaram os assinalamentos inequívocos dos prótons H-3, H-4, H-5 e H-8 (figura 51) bem como dos respetivos carbonos. Simultaneamente confirmou-se a presença de três carbonos aromáticos ligados a oxigénios, o que é comprovado pelas conexões dos prótons H-8, H-5 e dos metílicos (figura 52b).

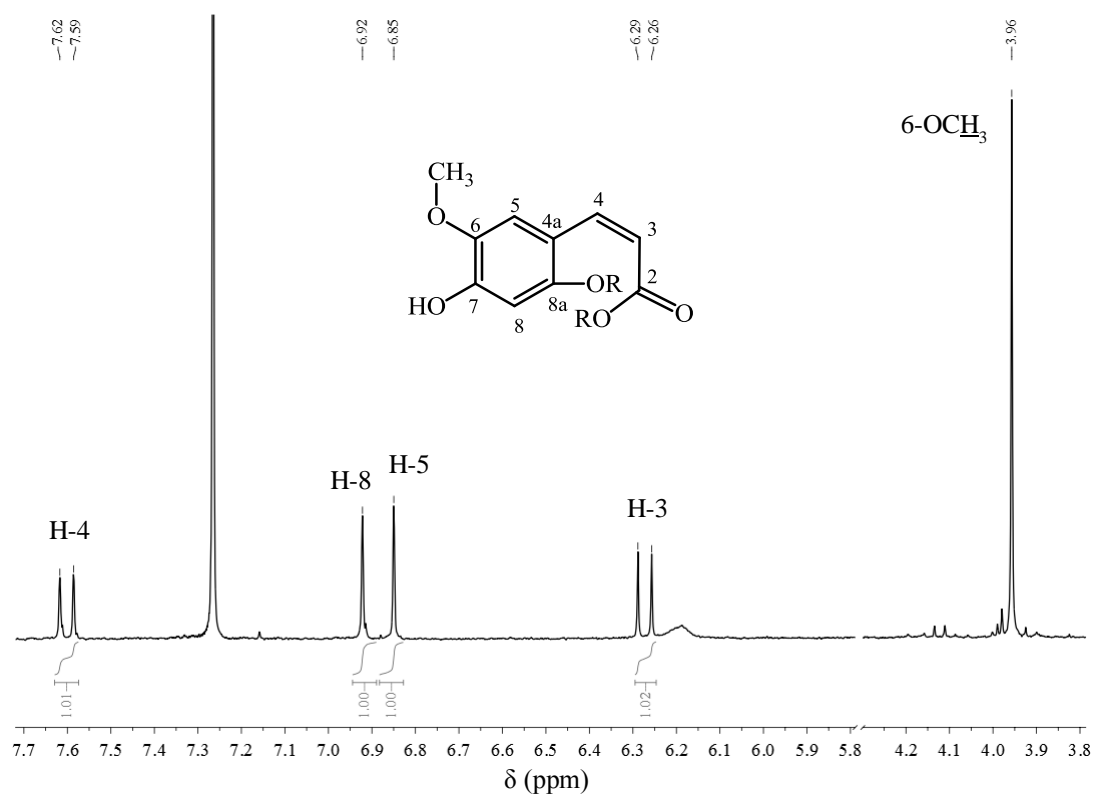


Figura 51 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H referente ao composto C

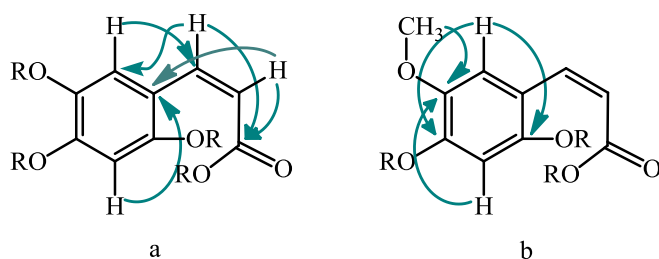


Figura 52 – Correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC

Os dados obtidos na análise dos espectros de RMN são consistentes com duas estruturas possíveis para o composto C, de ácido cinâmico (figura 53a) ou cumarina (figura 53b). A análise por espectrometria de massa revelou os picos a m/z 193 e 215, correspondentes a $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}]^+$, respectivamente. Estes dados permitem concluir que o composto C está na forma de cumarina (figura 53b).

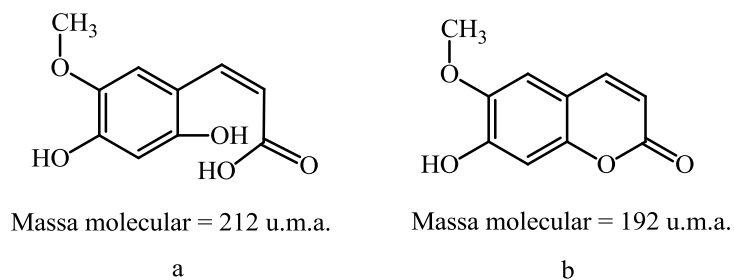


Figura 53 – Formas estruturais possíveis para o composto C

Este composto denomina-se 7-hidroxi-6-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (IUPAC) e é conhecido vulgarmente como escopoletina. Este é um composto natural bastante estudado, devido às vastas propriedades farmacológicas que exhibe, nomeadamente, atividades antibacteriana, antifúngica,^[155] antidepressiva^[156] e anticancerígena.^[157]

A biossíntese da escopoletina tem início na via do xiquimato,^[144,158] do mesmo modo que os compostos A, B1 e B2. Ocorre naturalmente na casca do bordo-açucareiro (*Acer saccharum* Marsh.),^[159] nas folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.),^[160] folhas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.),^[161] partes aéreas de *S. herbacea*,^[114] entre outras. Contudo, em *S. ramosissima*, ainda não tinha sido descrita até ao momento, a ocorrência deste metabolito.

O trabalho levado a cabo por Wang et al.^[114] conduziu à obtenção de 0,63 mg de escopoletina por 100 g de extrato de *S. herbacea* e comprovou o potente efeito antioxidante da escopoletina, quer na captação de radicais hidroxilo e superóxido, quer na redução do ferro. Neste estudo isolou-se cerca de 11,1 mg/100 g de extrato, o que sugere que a espécie *S. ramosissima* contém uma quantidade mais significativa deste metabolito que a *S. herbacea*. Portanto, de acordo com as propriedades farmacológicas da escopoletina^[114,155-157] espera-se que *S. ramosissima* apresente aplicações biológicas importantes, principalmente como antioxidante.

3.4. Caraterização estrutural do composto D

A análise dos espectros de RMN referentes ao composto D permitiu concluir que este composto não exibe semelhanças com os compostos anteriores. Não apresenta quaisquer sinais nas zonas características de prótons e carbonos aromáticos, nos respetivos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Por outro lado, a análise dos vários espectros indicou a existência de um esqueleto carbonado constituído por dois CH_2 e um CH , onde cada um destes carbonos estabelece uma ligação a um átomo de oxigénio. Os átomos de oxigénio pertencem a três grupos alcóxicarbonilo, que por sua vez são adjacentes a cadeias alifáticas longas. Com base nisto, concluiu-se que o composto D é um triglicérido. A estrutura do composto D está ilustrada na figura 54.

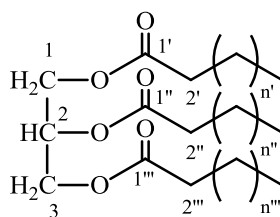


Figura 54 – Estrutura do composto D

As evidências espectroscópicas que permitiram a elucidação da estrutura do composto D (figura 54) foram as seguintes:

- A análise do espectro de RMN de ^{13}C permitiu concluir que existem três grupos alcóxicarbonilo na molécula, uma vez que se observam dois sinais a δ_{C} 172,9 e 173,3 ppm, característicos da ressonância de carbonos carbonílicos nestes grupos. O sinal a δ_{C} 173,3 ppm, quando comparado com o sinal a δ_{C} 172,9 ppm é aproximadamente o dobro, portanto, corresponde à ressonância de dois carbonos equivalentes, nomeadamente os carbonos C-1' e C-1''', enquanto que o sinal a δ_{C} 172,9 ppm corresponde apenas à ressonância de C-1''.

- No espectro de RMN de ^1H do composto D existem três sinais a δ_{H} 5,26 (*m*, 1H), 4,31 (*dd*, 2H), 4,15 (*dd*, 2H) ppm, cujos desvios químicos são característicos prótons cujos respetivos carbonos se encontram ligados a átomos fortemente eletronegativos como por exemplo o oxigénio. Cada um destes prótons apresenta correlações a longa distância com um dos carbonos carbonílicos (figura 55a), portanto conclui-se que estão de facto próximos de átomos de oxigénio.

- O próton H-2 (δ_H 5,26 ppm) exibe correlação com o carbono correspondente ao sinal a δ_C 68,9 ppm (C-2) (figura 56a). As correlações a longa distância (figura 55a) permitiram assinalar o carbono carbonílico C-1'' (δ_C 172,9 ppm) como pertencente ao grupo alcóxicarbonilo ligado a este CH. Por outro lado, o carbono H-2 também apresenta conectividade com o carbono correspondente a δ_C 62,1 ppm (figura 55a). Com base nas correlações no HSQC (figura 55b) foi possível determinar que este sinal corresponde à ressonância de dois carbonos, os carbonos C-1 e C-3, ambos vicinais ao carbono C-2.

- A multiplicidade e constantes de acoplamento dos sinais a δ_H 4,31 (2H) e 4,15 (2H) ppm sugerem que além do acoplamento vicinal com H-2 apresentam um acoplamento geminal, com uma constante $J = 11,8$ Hz, o que é comprovado pela correlação em HSQC ao mesmo carbono (figura 56a). Estes dados são consistentes com uma estrutura com algum impedimento de rotação das ligações simples, o que torna os prótons ligados ao mesmo carbono não equivalentes. Deste modo teremos os prótons H-1a e H-3a com acoplamento *anti* com o H-2 e os H-1b e H-3b com acoplamento *sin* com o H-2 (figura 56b).^[162]

- O sinal a δ_H 0,88 (*t*, $J = 7,0$ Hz) ppm, apresenta um integral correspondente à ressonância de 9 prótons, portanto, sugere a possibilidade da existência de três grupos metilo terminais. No espectro de HSQC verifica-se que estes prótons exibem correlação com o sinal a δ_C 14,1 ppm. Também este sinal apresenta uma intensidade elevada, relativamente a outros sinais no espectro de ^{13}C corroborando, assim, a hipótese de três grupos terminais.

- No espectro de RMN de 1H do composto D existe um sinal largo e intenso a δ_H 1,25 ppm. Tanto a intensidade, como a forma do sinal levam a ponderar a existência de uma ou mais cadeias alifáticas longas, cujos prótons serão todos equivalentes. As correlações a longa distância (figura 55b) permitiram concluir que se são de facto três cadeias carbonadas. Contudo, os dados da espectroscopia de RMN não permitiram concluir qual o número de carbonos nas cadeias alifáticas que constituem o composto. Num estudo cuidadoso dos sinais presentes nos vários espectros de RMN, deduziu-se que as três cadeias seriam iguais. Os carbonos secundários do glicerol são equivalentes, ou seja, a ressonância dos seus prótons aparece no mesmo sinal e isso só é possível existindo um eixo de simetria na molécula. Portanto assume-se que pelo menos a primeira e terceira cadeia serão idênticas.

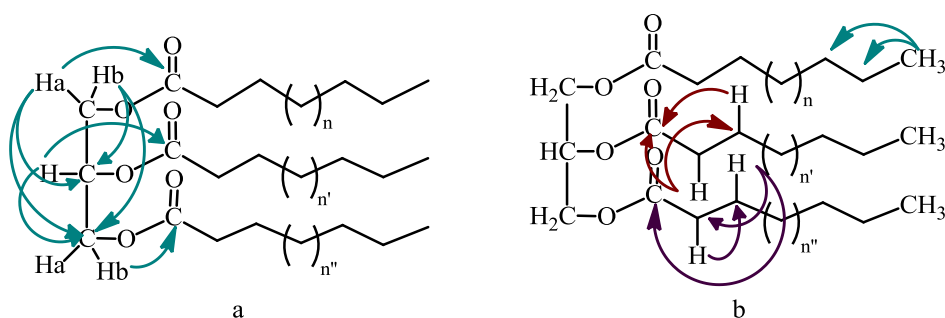


Figura 55 – Conetividades observadasno espectro de HMBC do composto D

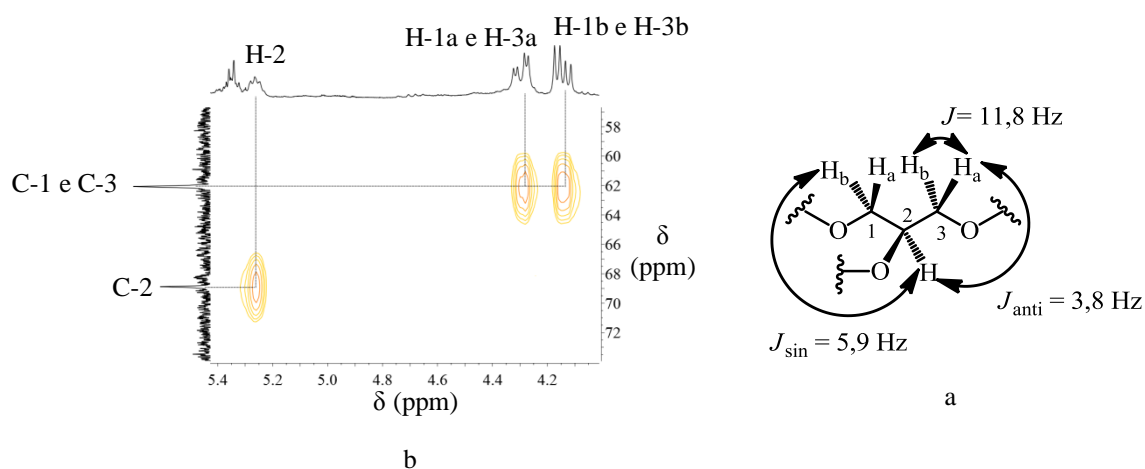


Figura 56 – a) Ampliação do espectro de HSQC do composto D e b) Configuração do glicerol no composto D

Para avaliar o número de átomos de cada cadeia, a fração correspondente a este composto foi analisada por GC-MS. Uma alíquota da amostra foi analisada após hidrólise alcalina e sililação e outra alíquota foi apenas analisada. Na hidrólise alcalina, o triglicérido é clivado, de acordo com a reação ilustrada na figura 57.

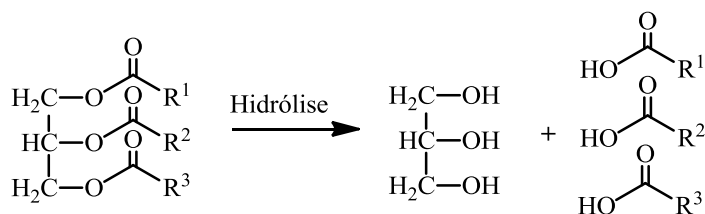


Figura 57 - Hidrólise de um triglicérido

Na amostra hidrolisada detetou-se e identificou-se o glicerol e um único ácido gordo, o ácido tetracosanóico ($C_{24:0}$). Os compostos foram detetados como derivados trimetilsililados e sua identificação foi realizada de acordo com o descrito em 2.1. Uma vez que só foi detetado um ácido gordo, concluiu-se que as três cadeias alifáticas são iguais e correspondem ao ácido tetracosanóico, sendo assim identificado o composto D como correspondendo a um triglicerídeo do ácido tetracosanóico (figura 58).

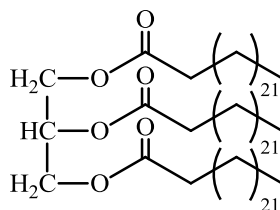


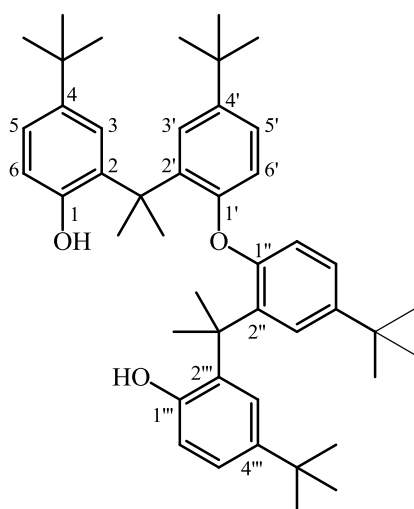
Figura 58 – Estrutura do triglicerídeo isolado

Os triglicerídeos são compostos comuns em plantas e animais, onde desempenham a função de reserva de energia. Em plantas oleaginosas, os triglicerídeos são componentes proeminentes das sementes ou frutas. Estes compostos são biossintetizados a partir da via metabólica do glicerol-3-fosfato, por transferência dos ácidos gordos para a molécula de glicerol-3-fosfato.^[142]

Embora sejam compostos comuns e bem conhecidos, no género *Salicornia* não existem muitas descrições da sua ocorrência. De facto, apenas El-Mallah *et al.*,^[66] descrevem a identificação de triglicerídeos, por HPLC, a partir da espécie híbrida SOS-7. Foram identificados 22 triglicerídeos, contendo cadeias correspondentes aos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolénico.^[66] Contudo, não foi identificado nenhum triglicerídeo constituído por cadeias de ácido tetracosanóico. Relativamente à *S. ramosissima*, até à data não existiam registos da identificação de triglicerídeos.

3.5. Caraterização estrutural do composto E

A análise cuidadosa dos espectros de RMN do composto E conduziu a uma estrutura única contendo dois anéis aromáticos trissubstituídos ligados entre si por um grupo $C(CH_3)_2$ e sendo os outros substituintes grupos *tert*-butilo e hidroxilo. Contudo para a determinação da estrutura final (figura 59) foi indispensável a obtenção do espectro de EM e da massa exata do composto.



MM = 662 u.m.a.

Figura 59 – Estrutura do composto E

Os dados espectroscópicos que permitiram a elucidação da estrutura do composto E foram os seguintes:

- Quatro sinais na zona característica da ressonância de prótons aromáticos, nomeadamente os sinais a δ_H 7,13 (*dd*, 4H, $J = 2,5; 8,6$ Hz), 7,35 (*d*, 2H, $J = 2,5$ Hz), 7,36 (*d*, 2H, $J = 2,5$ Hz) e 7,53 (*d*, 4H, $J = 8,6$ Hz) ppm (figura 60). Os dupletos a δ_H 7,35 e 7,36 ppm correspondem à ressonância de prótons muito semelhantes, portanto concluiu-se que estes prótons não pertencem ao mesmo anel aromático. Com base na multiplicidade e constante de acoplamento dos sinais a δ_H 7,13, 7,35 e 7,53 ppm concluiu-se que estes correspondem à ressonância de prótons H-5, H-3 e H-6, respetivamente. O próton H-5 acopla com o H-6 com constante de acoplamento *orto* de 8,6 Hz e com o H-3 com constante *meta* de 2,5 Hz. Dada a simetria da molécula, os sinais dos prótons H-5' e H-6' surgem com a mesma frequência de ressonância dos prótons H-5 e H-6, enquanto que o

sinal do próton H-3' surge a δ_H 7,36 ppm. A análise do espectro de HSQC (figura 61) possibilitou o assinalamento dos respectivos carbonos a δ_C 124,0 (C-5 e 5'), 119,0 (C-6 e 6') e 124,4 (C-3, 3') ppm.

- A δ_H 1,33 e 1,28 ppm (figura 60) surgem dois sinais na forma de singletos típicos da ressonância de prótons metílicos. A integração destes sinais, tendo em conta a existência de dois anéis aromáticos, sugere a presença de dois grupos *tert*-butilo, sinal a δ_H 1,28 ppm correspondente a 18H, e mais dois grupos ligados a um carbono não aromático (δ_H 1,33 ppm). As conexividades encontradas no espectro bidimensional HMBC mostraram que os prótons dos metílicos do grupo *tert*-butilo têm correlação a longa distância com dois carbonos quaternários a δ_C 34,5 e 147,0 ppm. Os prótons dos outros grupos metilo exibem conexividade com três carbonos quaternários, a δ_C 34,9, 138,4 e 138,5 ppm (figura 62a). Por outro lado, as conexividades dos prótons aromáticos H-3 e H-3' com os carbonos δ_C 34,5 e 34,9 ppm, bem como as conexividades dos prótons H-5 e H-5' com os carbonos a δ_C 34,5 ppm e dos prótons H-6 e H-6' com os carbonos a δ_C 147,0 e 138,5 ppm (figura 62a) demonstram que os grupos *tert*-butilo estão ligados aos carbonos C-4 e C-4' e que o grupo $C(CH_3)_2$ estabelece a ligação entre os dois anéis aromáticos. As restantes conexividades confirmaram os assinalamentos anteriormente referidos e possibilitaram o assinalamento dos carbonos aromáticos C-1 e C-1', os quais ligam átomos de oxigénio (figura 62b).

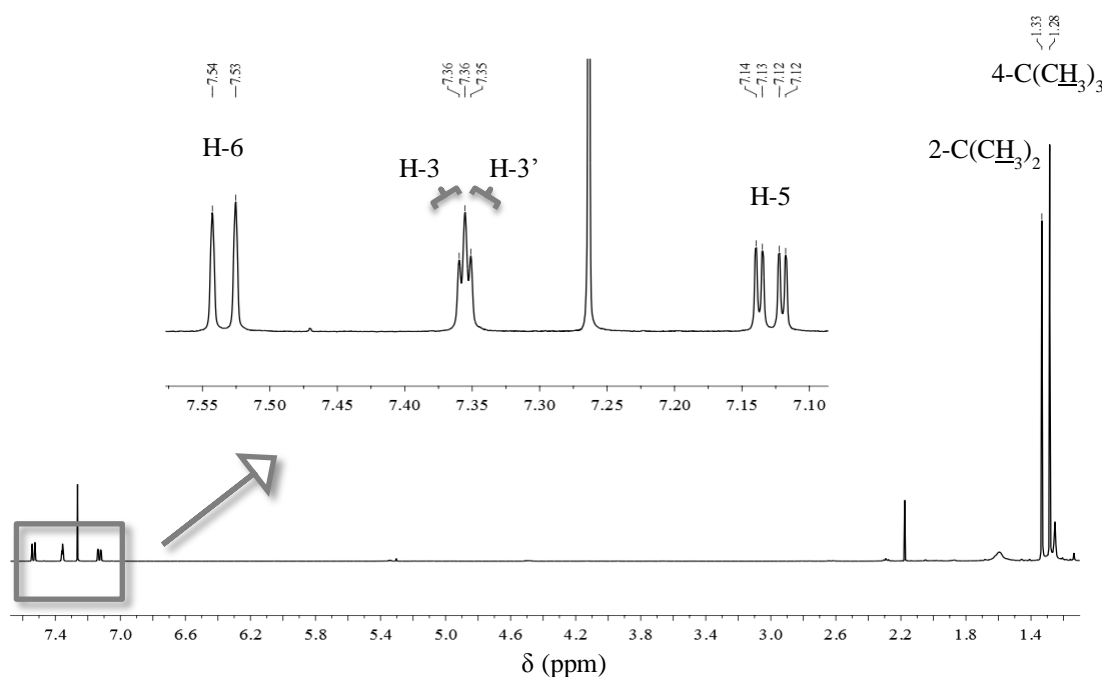


Figura 60 – Espectro de RMN de 1H do composto E

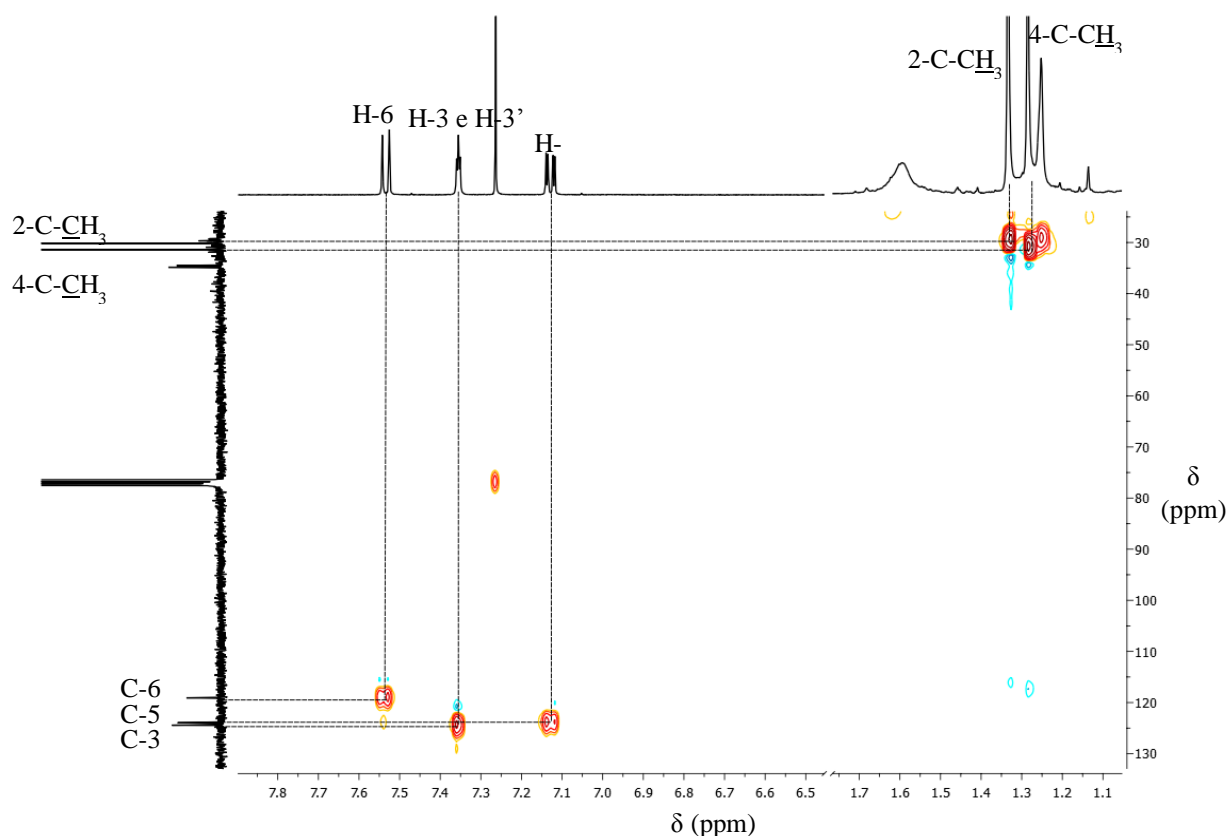


Figura 61 – Espetro de HSQC referente ao composto E

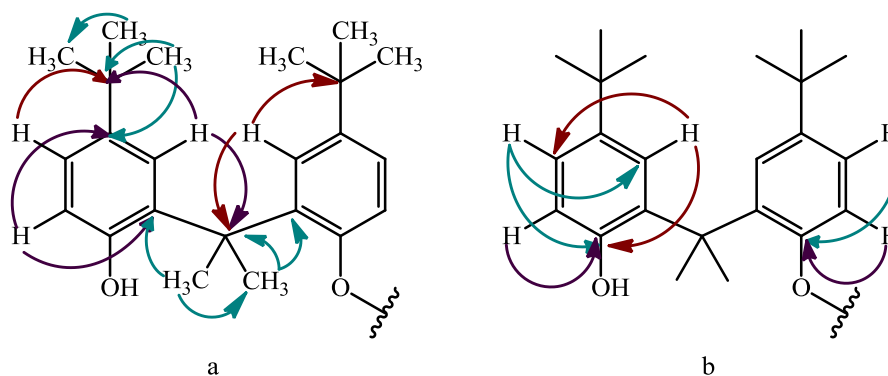


Figura 62 – Conetividades observadas no espectro de HMBC do composto E

Tal como referido anteriormente foi após a análise do espectro de massa (figura 63), onde se observam os picos a m/z 663 e 685, que correspondem a $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respetivamente, que surgiu a hipótese de uma estrutura dimérica. A determinação de massa exata do composto E mostrou o pico a m/z 663,47730, correspondente ao ião $[M+H]^+$, para a fórmula molecular $C_{46}H_{62}O_3$, o qual está de acordo com a estrutura proposta para o

composto E (figura 59). Tendo em conta a simetria da molécula, aparentemente, os espetros de RMN apenas mostram dados referentes a metade da molécula.

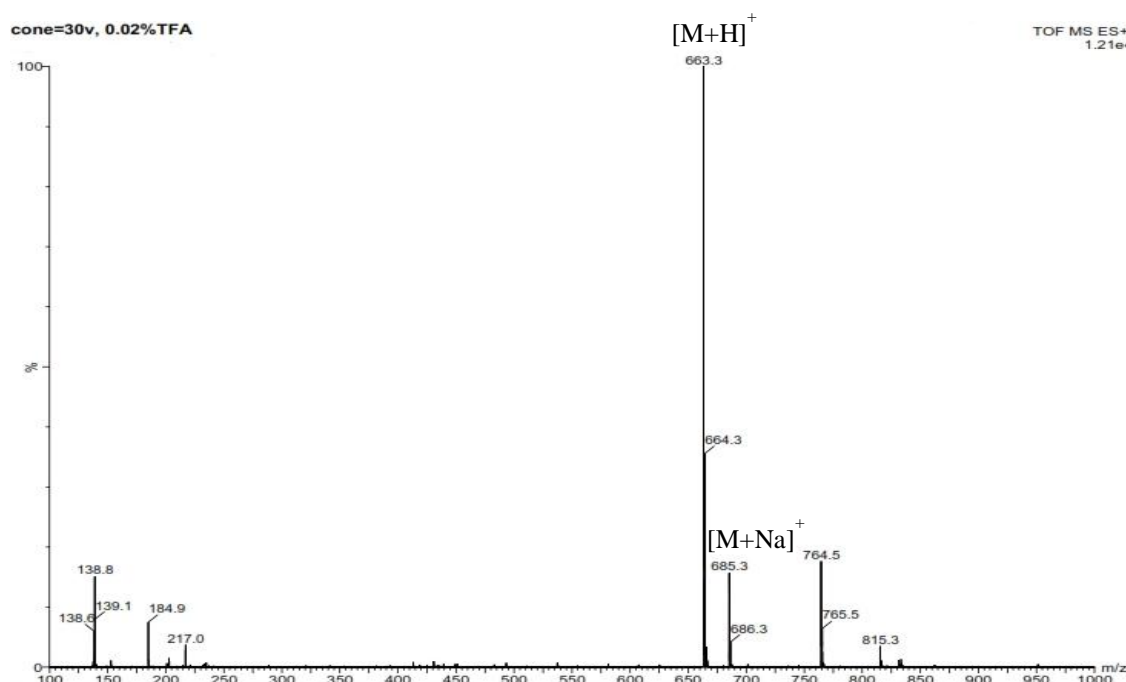


Figura 63 - Espetro de massa do composto E

Estamos então na presença de um composto natural novo, o 2,2'[(oxibis(3-*tert*-butil)-6,1-fenileno)]bis(propano-2,2-di-il)bis(4-*tert*-butil)fenol, o qual atribuímos o nome trivial de saliramofenol.

No género *Salicornia*, ainda não existiam evidências de compostos com substituintes *tert*-butilo. Os produtos naturais que contêm grupos *tert*-butilo como substituintes são considerados raros. Contudo, existem evidências de diferentes classes de compostos que contêm este grupo, nomeadamente, péptidos, terpenos, carbinois, ésteres e até uma cetona.^[163] Peptidos contendo uma unidade de *tert*-leucina (Tle) (figura 64) foram isolados a partir de esponjas marinhas. Estes compostos são responsáveis por atividades biológicas, antimitóticas^[164] ou antibióticas.^[165] Por outro lado, Nakanishi *et al.*^[166] elucidaram estruturas moleculares de ginkgolídeos (trilactonas terpénicas), que contêm o grupo estrutural *tert*-butilo. Os derivados de ginkgolídeos (exemplo na figura 65) são antagonistas do recetor do fator de ativação plaquetária. Estudos de relação-atividade comprovam que o grupo *tert*-butilo desempenha um papel essencial na atividade biológica

descrita. Este domínio é responsável pela ligação da molécula na cavidade hidrofóbica do recetor.^[167]

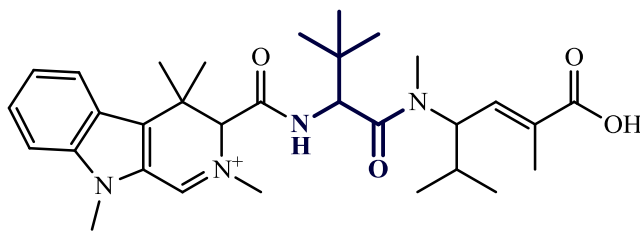


Figura 64 – Milnamideo D, péptido antimitótico que contém uma unidade de Tle (domínio a azul na molécula)^[164]

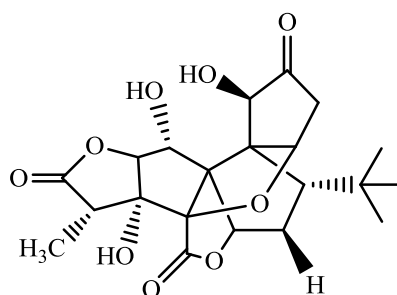


Figura 65 – Ginkgolídeo B, um potente antagonista *in vitro* do recetor do fator de ativação plaquetária^[167]

Apenas foram publicados alguns estudos sobre os aspetos da biossíntese do domínio *terc*-butilo.^[168-171] No entanto, o mecanismo de biossíntese ainda não está elucidado. Existem algumas especulações sobre a formação deste grupo pouco comum. Por exemplo, Moore e Hertwec^[171] consideram muito atrativa a possibilidade de um precursor *terc*-valerilo policetídeo, derivado a partir da Tle. No entanto, defendem que é mais provável que tenha origem num precursor isobutirato. O precursor isobutirato sofreria metilação pela SAM. Contudo, esta hipótese não foi confirmada por evidências experimentais.^[171]

3.6. Caraterização estrutural do composto F

O composto F constituiu o maior desafio em termos de caraterização estrutural. Numa rápida análise dos espectros de RMN deste composto salta à vista que a grande maioria dos sinais no espectro de RMN de ^1H (figura 66) correspondem à ressonância de prótons alifáticos (δ 2,30-0,84 ppm). A determinação de cadeias alifáticas não é de toda uma tarefa simples. Os prótons e carbonos são quimicamente semelhantes e por este motivo apresentam desvios químicos muito idênticos. Em conclusão os poucos sinais, no espectro de RMN de ^1H , correspondem à ressonância de inúmeros prótons indiferenciáveis. No espectro de RMN de ^{13}C (figura 67) figuram vários sinais, correspondentes à ressonância de carbonos, quimicamente muito semelhantes. Em conjunto com o espectro de DEPT foi possível concluir que a maioria destes sinais corresponde à ressonância de carbonos CH_2 .

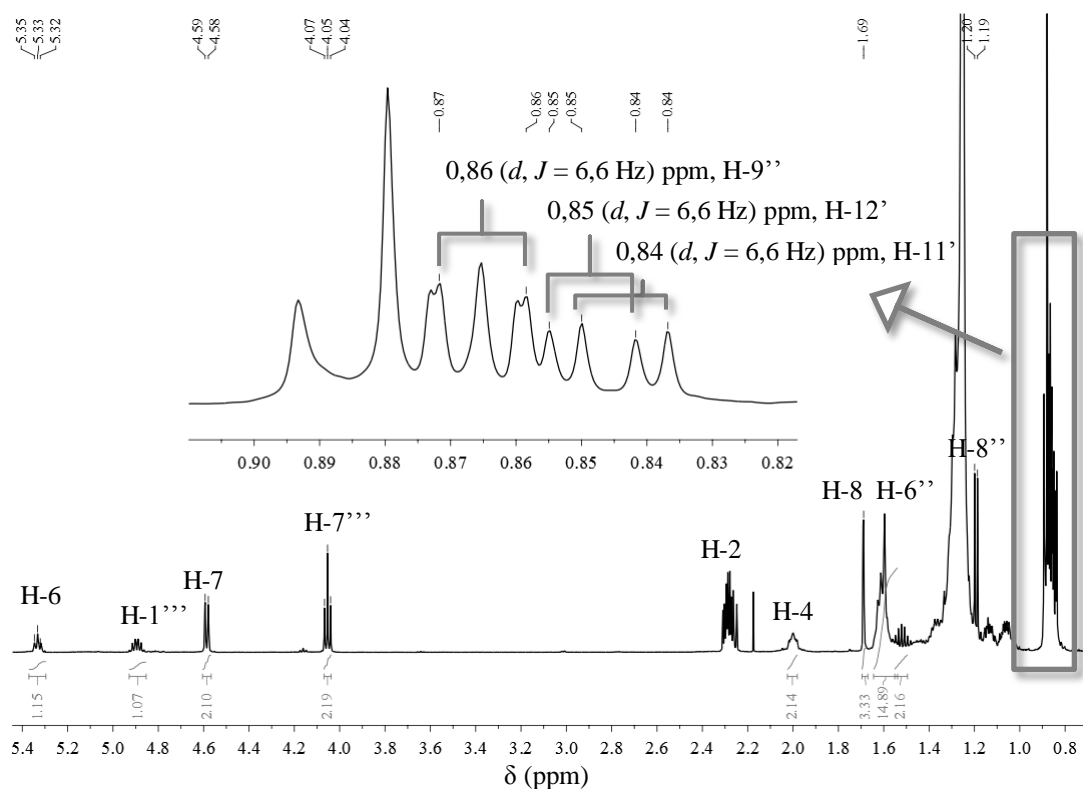


Figura 66 – Espectro de RMN de ^1H do composto F

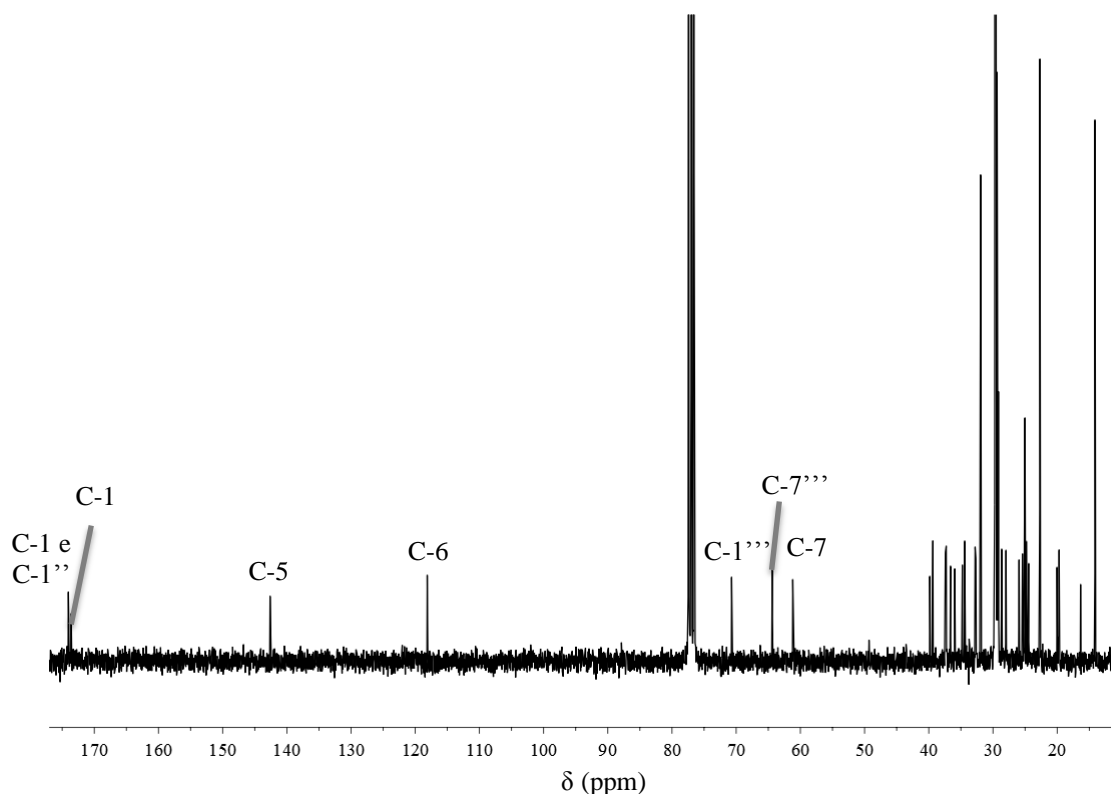


Figura 67 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto F

Para além dos sinais atrás referidos, os espectros de RMN de ^1H (figura 66) e ^{13}C (figura 67) exibem outros sinais dos quais se concluem algumas informações estruturais. São eles:

- No espectro de RMN de ^{13}C existem dois sinais correspondentes à ressonância de carbonos vinílicos (δ_{C} 142,6 e 118,1 ppm), os carbonos C-5 e C-6 (figura 67). No espectro de HSQC verifica-se que o carbono C-6 exibe correlação com o sinal de protão a δ_{H} 5,33 (*m*) ppm. Este valor do desvio químico reforça a ideia da presença de um sistema vinílico na molécula. Contudo, o carbono C-5 não exibe correlação com nenhum protão, logo concluiu-se que este carbono terá um substituinte.

- A δ_{H} 1,69 (*s*) ppm figura um sinal correspondente à ressonância de três protões (H-8) (figura 66). Neste caso a forma e multiplicidade do sinal sugerem que se tratam de protões metílicos e, que o grupo metilo se encontra ligado a um carbono quaternário. Estes protões metílicos (H-8) exibem conetividades com os dois carbonos anteriormente referidos, o que possibilitou concluir que este grupo metilo é o substituinte do sistema vinílico (figura 68a). Por outro lado, os protões H-8 apresentam conetividade com o

carbono a δ_c 39,8 ppm, que pelo espectro de DEPT foi comprovado tratar-se de um CH_2 , portanto concluiu-se que este é vicinal ao carbono vinílico C-5.

- A δ_H 4,59 ppm figura um sinal em forma de duplete ($J = 7,1$ Hz) correspondente à ressonância de dois prótons (H-7) (figura 66). Estes prótons exibem correlação com o carbono a δ_c 61,2 ppm. De acordo com o integral do sinal de próton e com os desvios químicos quer de próton, quer de carbono, foi possível concluir que se trata de um grupo CH_2 ligado a um átomo fortemente eletronegativo, provavelmente um átomo de oxigênio. De acordo com os sinais presentes no espectro de ^{13}C (figura 67) verifica-se que existem na molécula três carbonos carbonílicos (δ_c 173,6, 174,0 e 174,0 ppm), caraterísticos de grupos alcóxicarbonilos. O espectro de HMBC mostra que estes prótons (H-7) têm correlação a longa distância com um grupo carbonilo (δ_c 174,0 ppm) e com o carbono vinílico C-6 (figura 68b). Estas e outras conetividades que se encontram indicadas na figura 68a e 68b permitiram elucidar uma parte da estrutura do composto F.

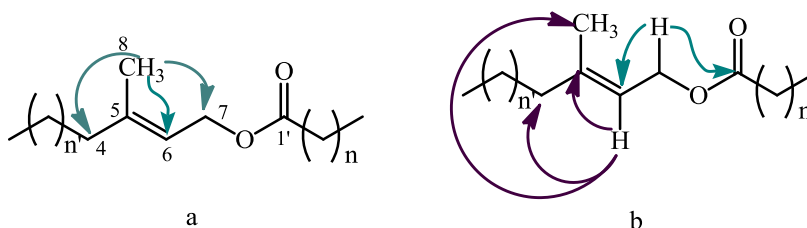


Figura 68 – Correlações a longa distância correspondentes ao 1º domínio elucidado da molécula F

- Os espectros bidimensionais de NOESY e COSY permitiram confirmar inequivocamente a existência desta parte da estrutura, bem como a configuração do sistema vinílico (figura 69). Destaca-se o efeito NOE entre os prótons metílicos H-8 e os prótons correspondentes ao sinal a δ_H 4,59 ppm (H-7) e o efeito NOE entre o próton vinílico H-6 e os prótons correspondentes ao sinal a δ_H 2,00 ppm (H-4) (figura 69), que provam a existência de uma configuração *E* no sistema vinílico.

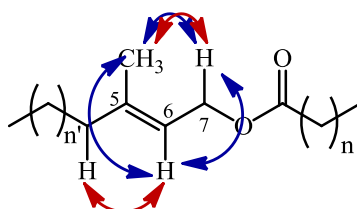


Figura 69 – Correlações observadas nos espectros de COSY (setas azuis) e NOESY (setas vermelhas) do composto F

- Verifica-se no espectro de ^1H (figura 66) a existência de um sinal a δ_{H} 4,90 (*m*, 1H, H-1''') ppm. De acordo com o respetivo integral e o espectro de DEPT conclui-se que este corresponde à ressonância de CH cujo carbono surge a δ_{C} 70,7 ppm. Um dos substituintes deste carbono é um átomo de oxigénio, que por sua vez está ligado a um carbono carbonílico cujo sinal surge a δ_{C} 173,6 ppm (C-1) (figura 67). As correlações a longa distância ilustradas na figura 70 justificam este facto. Simultaneamente, a δ_{H} 1,19 ppm existe um sinal em forma de duplete ($J = 6,2$ Hz) que corresponde à ressonância de três prótons metílicos, H-8''' (figura 66) e acopla com um próton. Os dados dos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC possibilitaram verificar que o próton é o correspondente ao sinal a δ_{H} 4,90 ppm (H-1'''), cujo respetivo carbono surge a δ_{C} 70,7 ppm. Os prótons metílicos exibem também conetividade com o carbono correspondente ao sinal a δ_{C} 36,0 ppm, correspondente a um grupo CH_2 (figura 70).

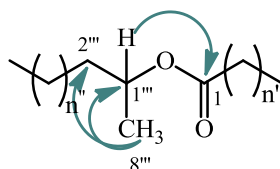


Figura 70 – Correlações a longa distância observadas para o 2º domínio elucidado do composto F

- O sinal a δ_{H} 4,05 (*t*, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-7''') ppm, corresponde à ressonância de dois prótons num grupo CH_2 que, tal como nos domínios anteriores, se liga a um átomo de oxigénio de um grupo alcóxicarbonilo, cujo carbono carbonílico surge a δ_{C} 174,0 ppm (C-1'') (figura 67). Os prótons em questão têm correlação a longa distância (figura 71) com o carbono correspondente ao sinal a δ 25,9 ppm, pelo DEPT um CH_2 .

- Existe um sinal no espectro de RMN de ^1H (figura 66) a δ_{H} 1,61 (*m*) ppm que exhibe correlação com dois sinais de carbono distintos, nomeadamente os sinais a δ_{C} 25,0 (de acordo com intensidade, este sinal correspondente à ressonância de vários CH_2) e o sinal a δ_{C} 28,6 ppm (corresponde à ressonância de C-6'', pelo DEPT um CH_2). Os prótons a δ_{H} 1,61 apresentam também conetividade com os carbonos correspondentes aos sinais a δ_{C} 64,4 (C-7'''), 34,4 (C-2'') e 174,0 (C-1'') ppm (figura 71). Estes dados permitiram elucidar o 3º domínio molecular, o qual apresenta o grupo alcóxicarbonilo com CH_2 de ambos os lados, tal como o ilustrado na figura 71.

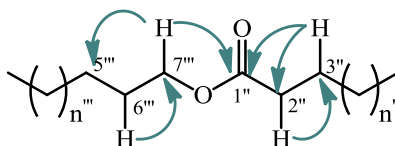


Figura 71 – Correlações a longa distância observadas para o 3º domínio elucidado do composto F

- No espectro de RMN de ^1H verifica-se a existência de três dupletos na zona de δ_{H} 0,87-0,84 ppm (assinalados na figura 66, com as respectivas constantes de acoplamento). Desvios químicos desta amplitude correspondem normalmente à ressonância de prótons em grupos metílicos terminais. De acordo com a forma dos sinais, concluiu-se que os grupos metílicos terminais encontram-se ligados a carbonos terciários (note-se que o sinal em forma de tripleto a δ 0,88 ppm não pertence à amostra em questão, facto comprovado pela análise dos restantes espectros do composto). Os prótons metílicos H-9'' correspondentes ao sinal a δ_{H} 0,86 ppm encontram-se ligados ao carbono correspondente ao sinal a δ_{C} 22,6 ppm e exibem conetividades (figura 72a) com os carbonos correspondentes aos sinais a δ_{C} 28,0 (C-10''), 32,7 (C-8'') e 39,4 (C-7'') ppm. Os prótons correspondentes ao sinal a δ_{H} 1,52 ppm (H-10'') encontram-se ligados ao carbono correspondente ao sinal a δ_{C} 28,0 ppm e exibem conetividade com o carbono δ_{C} 22,6 (C-9'') ppm. Estes dados permitiram concluir que um dos domínios terminais da molécula é composto por dois grupos metilo ligados a um carbono terciário (δ_{C} 32,7 ppm), que por sua vez estabelece a ligação a um CH_2 (δ_{C} 39,4 ppm) (figura 72a). O sinal de carbono a δ_{C} 19,7 ppm corresponde à ressonância de dois carbonos, com correlação com os prótons correspondentes aos sinais a δ_{H} 0,85 (H-12') e 0,84 (H-11') ppm (figura 66). Os prótons H-11' e H-12' apresentam correlações a longa distância com os carbonos correspondentes aos sinais a δ_{C} 32,8 (C-10') e 37,4 (C-9') ppm (figura 72b). Portanto, concluiu-se tratar-se de um grupo terminal idêntico ao anterior. Contudo, neste caso, não existe sinal no espectro de HMBC que comprove a conetividade dos prótons H-11' e H-12' (δ_{H} 0,84 e 0,85 ppm, respetivamente) com os carbonos correspondentes aos sinais a δ_{C} 19,7 ppm, como seria esperado.

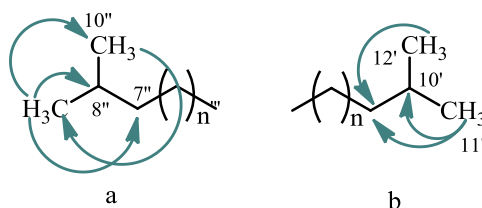


Figura 72 – Fragmentos terminais do composto F e respetivas correlações a longa distância

Os dados obtidos a partir da análise por RMN permitiram elucidar várias partes estruturais da molécula do composto F. Contudo, não existe indicação inequívoca do local de ligação destes grupos entre si ou se estão de facto ligados. O espectro de RMN de ^{13}C , ilustrado na figura 67, exhibe indicações que sugerem tratar-se de uma única molécula, uma vez que a intensidade dos sinais de carbono é proporcional entre si. Existem alguns sinais cuja intensidade é significativamente maior, no entanto, concluiu-se que estes sinais correspondem à ressonância de vários carbonos. Existe uma impureza nesta amostra, no entanto, foi possível excluir os sinais correspondentes à mesma por comparação dos vários espectros obtidos.

A EM por MALDI permitiu determinar que a massa molecular do composto F corresponde a 622 u.m.a., isto é uma fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{70}\text{O}_6$. Contudo, existem várias possibilidades de ligação das partes anteriormente elucidadas, o que pode originar moléculas distintas, como a mesma massa e cujos dados espectroscópicos se adequam. A estrutura proposta na figura 73 é uma das estruturas possíveis para o composto F.

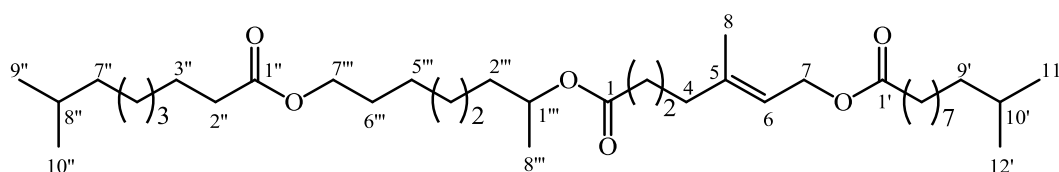


Figura 73 – Proposta de estrutura do composto F

Fora realizadas análises complementares de EM, nomeadamente ESI e MS-MS, as quais permitiram aceitar a estrutura proposta (figura 73) como uma das mais prováveis para o composto F. Em ESI não foi possível detetar o ião molecular, apenas foi detetado um pico a m/z 341, correspondente ao fragmento $[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_4 + \text{H}]^+$. Este mesmo fragmento origina o sinal a m/z 340 no espectro de MALDI MS-MS. Neste espectro são ainda observáveis os picos a m/z 172 e 200, que correspondem aos fragmentos $[\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2]^+$ e $[\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$, respetivamente. Os fragmentos descritos estão ilustrados na figura 74.

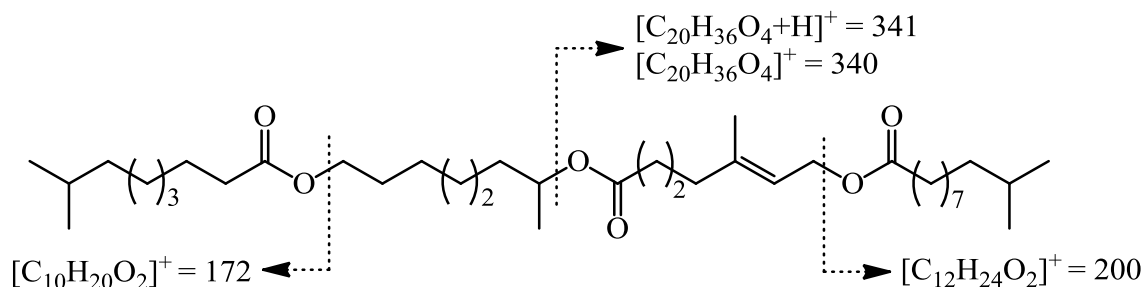


Figura 74 – Fragmentos observados nos vários espectros de massa obtidos para o composto F

O composto F denomina-se (*E*)-3-metil-7-((8-((8-metilnonanoil)oxi)octan-2-il)oxi)-7-oxohept-2-en-1-ilo 10-methylundecanoato e foi isolado e caracterizado pela primeira vez neste trabalho. Assim, atribuímos-lhe o nome comum de Saliramoester, com base na sua estrutura característica, composta por três grupos alcóxicarbonilo e obviamente pertencente à família dos ésteres orgânicos. As características estruturais deste composto sugerem que é um triéster, contendo longas cadeias carbonadas quer da parte proveniente dos ácidos carboxílicos quer da proveniente dos álcoois. Usualmente ésteres deste tipo são englobados no grupo das ceras, no entanto, as ceras naturais são monoésteres de longas cadeias carbonadas, consequentemente hidrofóbicas, e cuja via biossintética tem como precursor o acetil-CoA.^[142]

Sendo as ceras naturais mais comuns as constituídas por ácidos carboxílicos e álcoois de longas cadeias carbonadas, também são denominados de ceras outros compostos de cadeias longas carbonadas, com sejam os alcanos lineares, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos livres desde que a cadeia carbonada apresente mais do que 25 carbonos. As ceras são componentes ubíquos de todas as plantas, essencialmente das folhas, pois protegem a planta contra a perda de água e entrada de fungos e bactérias patogénicos.^[142]

O estudo do extrato de diclorometano das partes aéreas da *S. ramosissima* por métodos cromatográficos permitiu isolar e caracterizar os seis compostos aqui descritos. Foi a primeira vez que estes compostos foram descritos nesta espécie. Contudo, não é um número significativo de compostos quando se compara com o conhecimento fitoquímico de outras espécies do mesmo género. Ainda existe muito por descobrir acerca desta halófita.

4. Material e métodos

4.1 Reagentes, solventes, sílicas e equipamentos utilizados

Reagentes e solventes utilizados

- Os reagentes utilizados nas extrações (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ e EtOH) e na hidrólise alcalina (KOH e HCl) foram usados sem qualquer purificação prévia.
- Os solventes necessários para as extrações, nomeadamente, hexano, diclorometano, acetona e etanol, eram analiticamente puros.
- Com exceção do acetato de etilo, os solventes utilizados no fracionamento cromatográfico foram previamente destilados.
- Para a caracterização dos compostos por RMN utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente contendo tetrametilsilano (0,03%) (TMS) como padrão interno.
- Na derivatização das amostras, para análise CG-MS, foram utilizados piridina, bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (99%) e cloreto de trimetilsililo (TMSCl) (99%).
- Para a determinação do fator de resposta do aparelho de CG-MS foram utilizados os ácidos palmítico (95%), linoleico (99%) e gálico, o 1-pentadecanol (99%), 1-eicosanol (98%) e o colesterol (99%).
- O tetracosano (99%) foi utilizado como padrão interno nas análises por GC-MS.

Sílicas utilizadas

- A otimização dos eluentes para cada separação cromatográfica foi efetuada por cromatografia de camada fina, tlc analítico, em folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60 GF₂₅₄, da Merck.
- Os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) foram efetuados utilizando sílica gel 60 da Aldrich Chemistry de granulometria 63-200 μm (para massas extrato superiores a 6 g); e utilizando sílica gel 60 da Acrós Organics, de granulometria 35-70 μm (sílica “flash”), (para massas de extrato menores que 6 g).
- Nas purificações realizadas por cromatografia de camada fina preparativa, foram usadas placas de vidro (20 \times 20 cm), previamente revestidas com uma camada (0,5 mm de espessura) de sílica gel 60 GF₂₅₄, da Merck, e ativadas na estufa a 100-110°C durante 12-14 horas.

Equipamentos utilizados

- Nas cromatografias em camada fina, a visualização das manchas correspondentes à presença de compostos foi conseguida por observação das placas à luz ultravioleta a λ 254 e/ou a 366 nm, após a eluição dos compostos.
- Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, e NOESY foram obtidos à temperatura ambiente recorrendo a um de dois espectrómetros de ressonância magnética nuclear, BRUKER AVANCE 300 ou BRUKER AVANCE 500, operando a uma frequência de ressonância de próton de 300,13 e 500,13 MHz, respetivamente. Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.
- Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Micromass Q-ToF-2TM, recorrendo-se à técnica de electrospray como fonte de ionização operando com o cone a 30 V. Os dados obtidos a partir dos espectros de massa são apresentados em termos de razão massa/carga (m/z) dos iões correspondentes.

- A espectrometria de massa de alta resolução foi adquirida por requisição a serviço exterior (espectrómetro MicroTof com gerador de iões Apollo II ESI)
- A análise por GC-MS foi realizada no Trace Gas Chromatograph 2000 Series, equipado com um espectrómetro de massa Finningan Trace MS.

Condições cromatográficas:

- **Gás de arrasto:** Hélio (35 cm.s^{-1}).
- **Coluna capilar:** DB-1 J&W
 - $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm}$ diâmetro interno;
 - $0,25 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura do filme.
- **Programa de temperatura:**
 - Temperatura do injetor: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - Temperatura inicial: $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min;
 - Variação de temperatura: $4 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$;
 - Temperatura final: $285 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min;
 - Temperatura da linha de transferência: $290 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Modo de injeção:** “Split”, razão de separação: 1:50.

Condições do espectrómetro de massa:

- **Tipo de ionização:** impacto eletrónico, 70 eV.
- **Temperatura da fonte de ionização:** 250°C .
- **Recolha dos dados:**
 - 1 scan.s^{-1} ;
 - m/z de 33 a 750.

4.2. Material vegetal

O material vegetal foi colhido na Marinha dos Puxadoiros ($40^{\circ} 39' 22'' \text{ N}$, $8^{\circ} 40' 30'' \text{ W}$ 40°), localizada na Ria de Aveiro, no estado vegetativo, entre Maio e Julho de 2011. A espécie foi identificada como *Salicornia ramosissima* J. Woods pela Professora Doutora Helena Silva, pertencente ao Herbário do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Com a finalidade de estudar o efeito da água de irrigação nos compostos lipofílicos extratáveis da planta, foram colhidas duas amostras distintas de *S. ramosissima*, no local atrás referido, também no estado vegetativo e na mesma data, mas que se desenvolveram com condições de irrigação distintas. Uma amostra cresceu com irrigação natural (**NE**) e a outra com irrigação adicional com água do canal (salgada) de 15 em 15 dias (**E**).

4.3. Obtenção dos extratos

A parte aérea da planta (1087,6 g), seca em estufa a 60 °C, foi cortada em pequenas porções (inferiores a 5 mm) e extraída sucessivamente com solventes de polaridade crescente, num sistema fechado, com agitação constante, à temperatura ambiente, em 2 ciclos de 72 h cada (figura 75). Por cada grama de planta seca usou-se cerca de 5 mL de solvente.

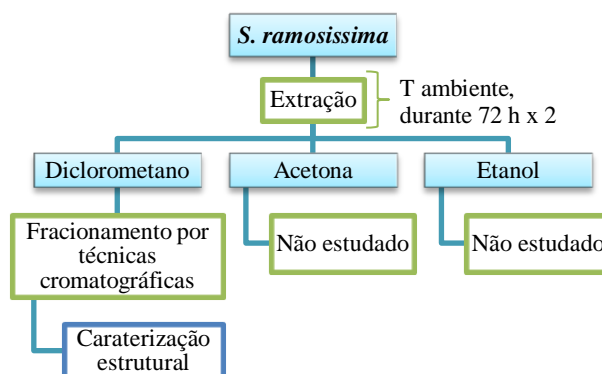


Figura 75 – Esquema referente à metodologia de extração das partes aéreas de *S. ramosissima*

Os extratos assim obtidos foram filtrados a vácuo, evaporados até à secura num evaporador rotativo, e os resíduos depois de bem secos foram pesados. As massas dos extratos de diclorometano, acetona e etanol secos foram 18,1 g (16,64 mg/g de material seco), 8,0 g (7,36 mg/g de material seco) e 32,9 g (30,25 mg/g de material seco), respetivamente.

Aproximadamente 100 g de *S. ramosissima*, de cada uma das condições de crescimento (**NE** = 104,8 g e **E** = 103,5 g), foram extraídas com hexano, do mesmo modo descrito previamente. As massas finais dos extratos secos de **NE** e **E** foram 0,435 g (4,15

mg/g de material seco) e 0,416 g (4,02 mg/g de material seco), respetivamente. A figura 76 exemplifica a obtenção dos extratos **NE** e **E**.

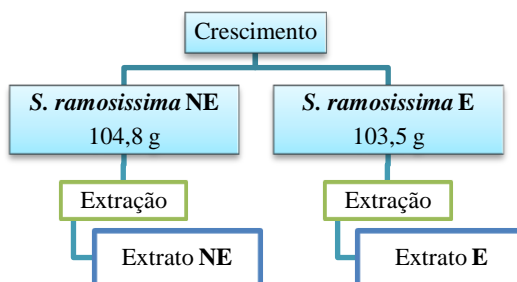


Figura 76 – Esquema da obtenção dos extratos de hexano **NE** e **E**

4.4. Análise do extrato de Hexano, por GC-MS

Os extratos de hexanos de *S. ramosissima* de cada uma das condições de crescimento (**NE** e **E**) foram analisados quantitativamente por GC-MS segundo a metodologia esquematizada na figura 77.

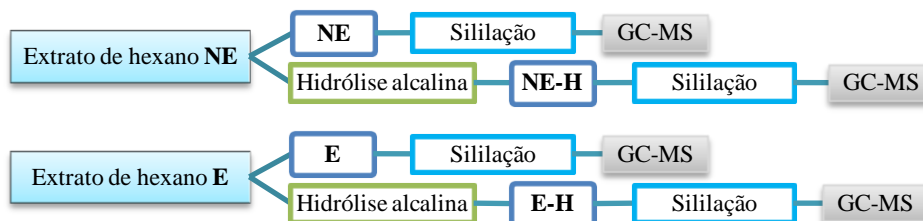


Figura 77 – Esquema da metodologia para análise por GC-MS dos extratos de hexano **NE** e **E**

Hidrólise alcalina

Dissolveram-se 20 mg de cada extrato em 10 mL de KOH (1 mol.dm^{-3}), em metanol (10%). A mistura foi aquecida a 100°C , sob atmosfera de azoto durante 1h. A mistura reacional foi arrefecida e acidificada (com HCl 1 mol.dm^{-3}), até pH~2, para terminar a reação. Posteriormente extraiu-se três vezes com diclorometano, a fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado até à secura.

Sililação

20 mg de cada amostra foram sililadas antes e após hidrólise, segundo o procedimento descrito na literatura,^[172,173] cada resíduo foi dissolvido em 250 µL de solução de tetracosano (padrão interno, 4,02 mg/mL) em piridina e foi-lhe adicionado 250 µL de BSTFA e 50 µL de TMSCl. A mistura foi aquecida durante 30 min, a 70 °C.

Análise quantitativa

Para a análise quantitativa, foi calculado o fator de resposta usando soluções de compostos de referência puros (ácidos palmítico, linoleico e gálico, 1-pentadecanol, 1-eicosanol, colesterol e tetracosano) após sililação e injeção (em triplicado) no mesmo GC-MS e nas mesmas condições utilizadas na análise dos extratos. Os resultados da quantificação de cada composto são uma média dos 3 valores resultantes das 3 injeções (variação entre injeções da mesma amostra menor que 5%).

O fator de resposta foi calculado segundo a seguinte expressão:

$$Fr = \frac{mc \times Api}{(mpi \times Ac)}$$

Onde: Fr = fator de resposta do composto

mc = massa do composto na solução

Api = área do pico correspondente ao padrão interno (tetracosano)

mpi = massa do padrão interno na solução

Ac = área do pico correspondente ao composto

Os fatores de resposta obtidos estão ilustrados na tabela 2.

Tabela 2 – Fatores de resposta calculados para os compostos de referência puros.

Composto	Fator de resposta (valor médio)
1-pentadecanol	0,391
Ácido gálico	0,196
Ácido palmítico	0,440
Ácido linoleico	0,398
Eicosanol	0,562
Tetracosano	1,000
Colesterol	0,464

4.5. Análise do extrato de diclorometano

O extrato de diclorometano (18,1 g) foi fracionado por cromatografia em coluna, utilizando misturas de eluentes de diferentes polaridades, sendo as frações obtidas re-cromatografadas, sempre que necessário, até à obtenção de compostos puros. A figura 78 ilustra o esquema de fracionamento e sistemas de eluentes necessários para a obtenção dos compostos A a E.

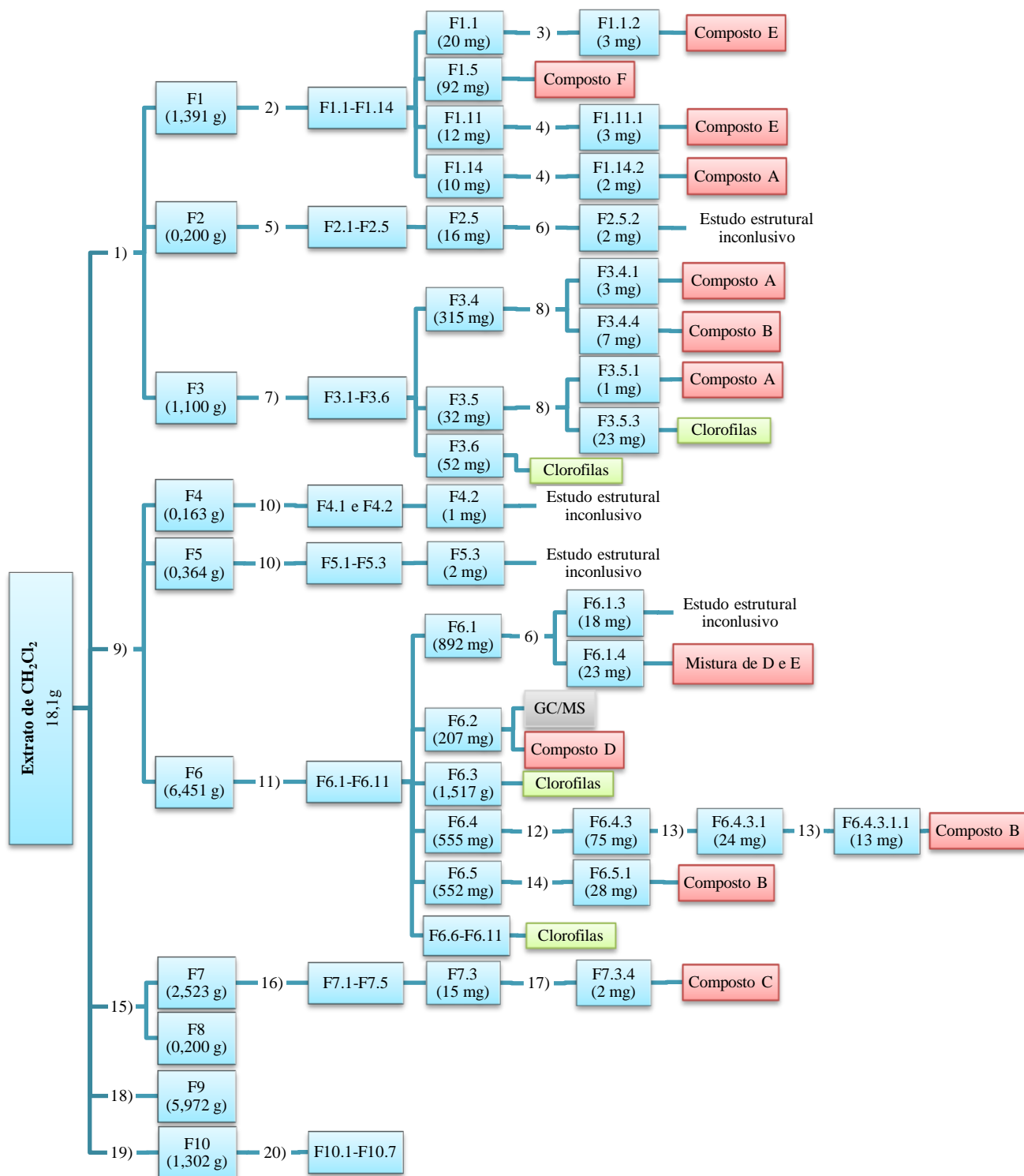


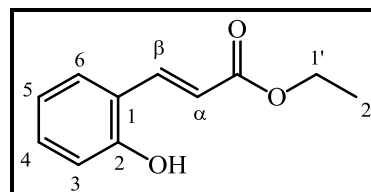
Figura 78 – Esquema do fracionamento do extrato de diclorometano

Condições experimentais: 1) CC, Hex/CH₂Cl₂ (1:9); 2) CC, Hex/CHCl₃ [0-100%]; 3) tlc, Hex/ CH₂Cl₂ (6:4); 4) tlc, Hex/AcEt (85:15); 5) tlc, Hex/CH₂Cl₂ (4:6); 6) tlc, Hex/AcEt (8:2); 7) CC, Hex/AcEt [0-50%]; 8) tlc, Hex/AcEt (9:1) (2x); 9) CC, CH₂Cl₂; 10) tlc, Hex/CH₂Cl₂ (4:6) (2x); 11) CC, Hex/AcEt [0-100%], AcEt/MeOH [30-100%]; 12) CC, Hex/AcEt [0-100%]; 13) tlc, CH₂Cl₂; 14) tlc, CH₂Cl₂ (2x); 15) CC, CH₂Cl₂/AcEt (3:7); 16) CC, CH₂Cl₂/AcEt [0-30%]; 17) tlc, Hex/AcEt (5:5); 18) AcEt/EtOH (5:5); 19) CC, EtOH; 20) MeOH/2-PrOH [0-30%].

4.6. Dados espectroscópicos

Composto A: (E)-2-hidroxicinamato de etilo

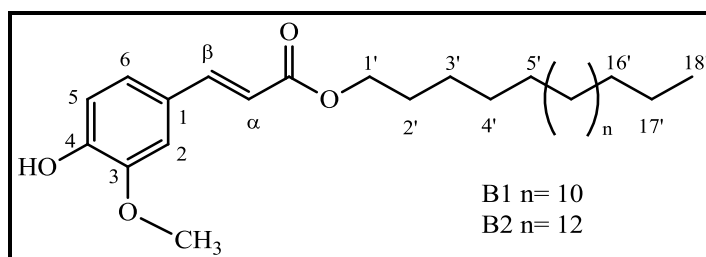
RMN de ^1H (500,13 MHz) δ : 1,35 (*t*, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-2'), 4,28 (*q*, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-1'), 6,43 (*d*, 1H, $J = 16,0$ Hz, H- α), 7,29 (*m*, 1H, H-5), 7,31 (*m*, 1H, H-4), 7,42 (*dd*, 1H, $J = 1,6; 7,8$ Hz, H-3), 7,62 (*dd*, 1H, $J = 2,0; 7,5$ Hz, H-6), 8,09 (*d*, 1H, $J = 16,0$ Hz, H- β).



RMN de ^{13}C (75,47 MHz) δ : 14,3 (C-2'), 60,7 (C-1'), 120,9 (C- α), 127,1 (C-5), 127,6 (C-6), 130,2 (C-3), 131,0 (C-4), 132,8 (C-1), 134,9 (C-2), 140,4 (C- β), 166,5 (C(O)O).

EM (TOF MS ESI+) m/z : 215 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Compostos B1 e B2: (E)-ferulato de octadecanilo (B1) e (E)-ferulato de eicosanilo (B2)



RMN de ^1H (300,13 MHz) δ : 0,88 (*t*, 3H, $J = 6,7$ Hz, H-18'), 1,25 (*m*, 28H, H-4' a H-17'), 1,35 (*m*, 2H, H-3'), 1,69 (*m*, 2H, H-2'), 3,93 (*s*, 3H, 3-OCH₃), 4,19 (*t*, 2H, $J = 6,7$ Hz, H-1'), 5,85 (*s*, 1H, 4-OH), 6,29 (*d*, 1H, $J = 15,9$ Hz, H- α), 6,91 (*d*, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5), 7,03 (*d*, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2), 7,07 (*dd*, 1H, $J = 1,8; 8,2$ Hz, H-6), 7,61 (*d*, 1H, $J = 15,9$ Hz, H- β).

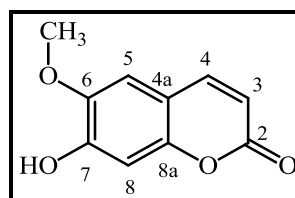
RMN de ^{13}C (75,47 MHz) δ : 14,1 (C-18'), 22,7 (C-17'), 26,0 (C-3'), 28,8 (C-2'), 29,3 (C-4'), 29,5-29,7 (C-5'a C-15'), 31,9 (C-16'), 55,9 (3-OCH₃), 64,6 (C-1'), 109,2 (C-2), 114,7 (C-5), 115,7 (C- α), 123,0 (C-6), 127,0 (C-1), 144,6 (C- β), 146,7 (C-3), 147,8 (C-4), 167,4 (C(O)O).

B1 EM (TOF MS ESI+) m/z : 447 [M+H]⁺, 469 [M+Na]⁺, 915 [M-Na-M]⁺.

B2 EM (TOF MS ESI+) m/z : 475 [M+H]⁺, 497 [M+Na]⁺, 971 [M-Na-M]⁺.

Composto C: Escopoletina

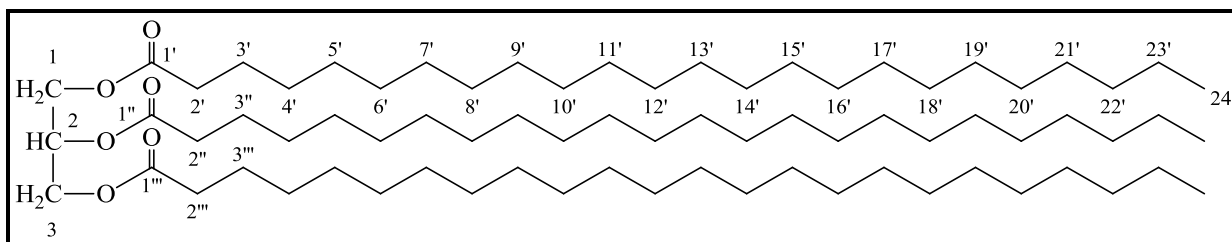
RMN de ^1H (300,13 MHz) δ : 3,96 (*s*, 3H, 6-OCH₃), 6,27 (*d*, 1H, *J* = 9,5 Hz, H-3), 6,85 (*s*, 1H, H-5), 6,92 (*s*, 1H, H-8), 7,60 (*d*, 1H, *J* = 9,5 Hz, H-4).



RMN de ^{13}C (75,47 MHz) δ : 56,4 (6-OCH₃), 103,2 (C-8), 107,5 (C-5), 111,5 (C-4a), 113,4 (C-3), 143,3 (C-4), 144,3 (C-6), 150,1 (C-7, C-8a), 161,7 (C-2).

EM (TOF MS ESI+) m/z : 193 [M+H]⁺.

Composto D: Triglicerídeo do ácido tetracosanóico

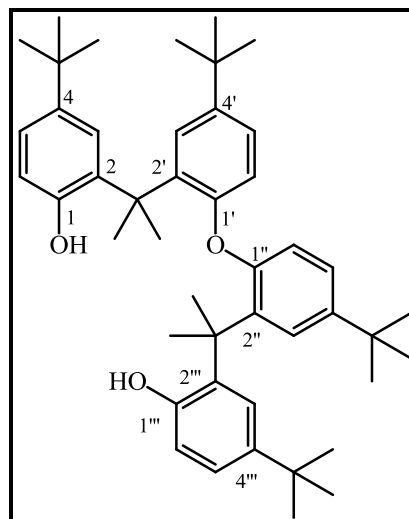


RMN de ^1H (500,13 MHz) δ : 0,88 (*t*, 9H, *J* = 7,0 Hz, H-24', 24'', 24'''), 1,25 (*m*, 120H, H-4' a 23', H-4'' a 23'', H-4''' a 23'''), 1,63 (*m*, 6H, H-3', 3'', 3'''), 2,29 (*t*, 6H, *J* = 7,6 Hz, H-2', 2'', 2'''), 4,15 (*dd*, 2H, *J* = 5,9; 11,8 Hz, H-1b, 3b), 4,31 (*dd*, 2H, *J* = 3,8; 11,8 Hz, H-1a, 3a), 5,26 (*m*, 1H, H-2).

RMN de ^{13}C (75,47 MHz) δ : 14,1 (C-24', 24'', 24'''), 22,7 (C-23', 23'', 23'''), 24,7 (C-3', 3'', 3'''), 29,0-29,6 (C-4' a 21', C-4'' a 21'', C-4''' a 21'''), 31,9 (C-22', 22'', 22'''), 34,0 (C-2', 2'', 2'''), 62,1 (C-1, 3), 68,9 (C-2), 172,9 (C-1'), 173,3 (C-1', 1'').

Composto E: Saliramofenol

RMN de ^1H NMR (500,13 MHz) δ :
 1,28 (s, 36H, 4, 4', 4'', 4'''-C(CH₃)₃), 1,33 (s, 12H, 2, 2''-C(CH₃)₂), 7,13 (dd, 4H, $J = 2,5$; 8,6 Hz, H-5, 5', 5'', 5'''); 7,35 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz, H-3', 3'')*, 7,36 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz, H-3, 3'')*, 7,53 (d, 4H, $J = 8,6$ Hz, H-6, 6', 6'', 6'''). (* Podem estar trocados)

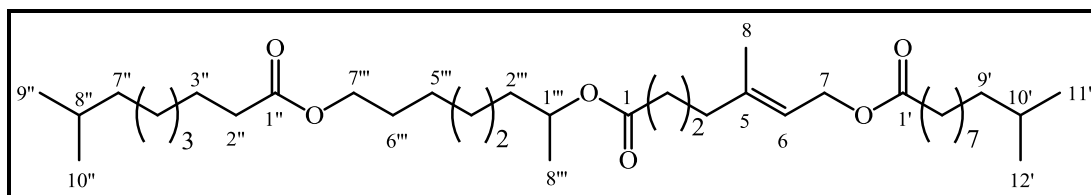


RMN de ^{13}C NMR (75,47 MHz) δ : 30,2 (2, 2''-C(CH₃)₂), 31,4 (4, 4', 4'', 4'''-C(CH₃)₃), 34,5 (4, 4', 4'', 4'''-C(CH₃)₃), 34,9 (2, 2''-C(CH₃)₂), 119,1 (C-6, 6', 6'', 6'''), 124,0 (C-5, 5', 5'', 5'''), 124,4 (C-3, 3', 3'', 3'''), 138,4 (C-2', 2'')#, 138,5 (C-2, 2')#, 147,0 (C-4, 4', 4'', 4'''), 147,6 (C-1, 1'')*, 147,7 (C-1', 1')*. (* e # Podem estar trocados entre si)

EM (TOF MS ESI+) m/z : 663 [M+H]⁺ e 685 [M+Na]⁺.

Massa exata (MicroTOF ESI-HR) m/z : 663,47730 [M+H]⁺ (663,47717 calculada para C₄₆H₆₃O₃).

Composto F: Saliramoester



RMN de ^1H NMR (500,13 MHz) δ : 0,84 (*d*, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-11'), 0,85 (*d*, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-12'), 0,86 (*d*, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-9''), 1,19 (*d*, 3H, $J = 6,2$ Hz, H-8''), 1,25 (*m*, 2H, H-5''), 1,36 (*m*, 1H, H-8''), 1,40 (*m*, 2H, H-7''), 1,52 (*m*, 2H, H-2''), 1,52 (*m*, 3H, H-10''), 1,59 (*m*, 2H, H-6''), 1,69 (*s*, 3H, H-8), 2,00 (*m*, 2H, H-4), 2,25 (*m*, 2H, H-2), 2,29 (*m*, 2H, H-2''), 4,05 (*t*, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-7''), 4,59 (*d*, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-7), 4,90 (*m*, 1H, H-1''), 5,33 (*m*, 1H, H-6).

RMN de ^{13}C NMR (75,47 MHz) δ : $\delta = 16,4$ (C-8), 19,7 (C-1, 12'), 20,0 (C-8''), 22,6 (C-9''), 25,9 (C-5''), 28,0 (C-10''), 28,6 (C-6''), 32,7 (C-8'), 32,8 (C-10'), 34,4 (C-2'), 34,8 (C-2), 36,0 (C-2''), 37,4 (C-9'), 39,4 (C-7'), 39,8 (C-4), 61,2 (C-7), 64,4 (C-7''), 70,7 (C-1''), 118,1 (C-6), 142,6 (C-5), 173,6 (C-1), 174,0 (C-1', 1'').

EM (TOF MS MALDI+) m/z : 622 $[\text{M}]^+$.

EM (TOF MS ESI+) m/z : 341 $[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_4 + \text{H}]^+$.

EM (TOF MS-MS MALDI+) m/z : 172 $[\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2]^+$, 200 $[\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$, 340 $[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_4]^+$.

5. Conclusão

No âmbito deste trabalho foi estudado por GC-MS o extrato de hexano, das partes aéreas de *S. ramosissima*. Neste extrato foi possível identificar e quantificar 57 compostos nesta espécie do género *Salicornia*, com destaque para o elevado número de ácidos gordos saturados e insaturados, de diácidos, de álcoois, de alguns esteróis e de compostos aromáticos. Alguns dos compostos detetados no extrato e aqui reportados, tanto quanto foi possível verificar, foi a primeira vez que foram identificados neste género. São o caso dos diácidos e dos hidroxí-ácidos: ácidos sucínico, málico, subérico, azelaíco e 2-hidroxí-heptanóico.

Todos os compostos detetados por GC-MS ocorrem maioritariamente na forma livre, com exceção dos ácidos 2-hidroxí-heptanóico, ferúlico e isoferúlico e do álcool tridecan-2-ol que existem na planta exclusivamente na forma esterificada. Ainda assim existe algum teor de ácidos gordos e álcoois na forma esterificada e em termos de massa, os ácidos gordos são os que mais contribuem para o teor total de compostos na forma de ésteres. Os álcoois correspondem ao grupo de compostos maioritário nas amostras não hidrolisadas enquanto os ácidos gordos são os mais abundantes nas amostras hidrolisadas. O ácido palmítico é o composto mais abundante identificado nos extratos, seguido pelo tetracosanol.

Avaliou-se a influência da água de irrigação no teor de compostos lipofílicos produzidos nesta halófita e concluiu-se que existe um aumento na produção de compostos na forma esterificada quando a planta cresce em condições de irrigação em excesso. Este aumento é mais significativo para os ácidos gordos saturados, diácidos e álcoois.

Este trabalho versou também o estudo fitoquímico do extrato de diclorometano das partes aéreas da *S. ramosissima* o que possibilitou a purificação e caracterização de quatro compostos pela primeira vez no género *Salicornia*: o 2-hidroxícinamato de etilo, o (*E*)-ferulato de octadecanilo e o (*E*)-ferulato de eicosanilo e o triglicerídeo do ácido tetracosanóico e ainda a purificação e caracterização da escopoletina pela primeira vez na *S. ramosissima*.

É, no entanto de destacar que este estudo possibilitou o isolamento e caracterização de dois novos compostos naturais, o 2,2'-((oxibis(3-(*terc*-butil)-6,1-fenileno))bis(propano-2,2-di-il))bis(4-(*terc*-butil)fenol e o (*E*)-10-metilundecanoato de 3-metil-7-(8-(8-metilnonanoiloxi)octan-2-iloxi)-7-oxo-hept-2-en-1-ilo, aos quais atribuímos, respectivamente, a designação trivial de saliramofenol e saliramoester. Estes dois compostos apresentam arquiteturas moleculares incomuns. O saliramoester caracteriza-se por três grupos alcóxicarbonílo reunidos numa única estrutura (triéster). Apresenta uma estrutura semelhante à das ceras, contudo as ceras mais comuns são monoésteres. O saliramofenol apresenta grupos *terc*-butilo como substituintes nos anéis aromáticos, os quais são bastante raros na natureza.

Embora este estudo tenha permitido conhecer um pouco dos metabolitos secundários produzidos pela halófita *S. ramosissima*, ainda há muito para descobrir. Os extratos de acetona e etanol, preparados no início deste trabalho a quando da obtenção dos extractos de hexano e diclorometano estão ainda guardados e algumas das frações mais polares do extrato de diclorometano também, podendo vir a ser objeto de estudo num futuro próximo, usando outras técnicas de separação cromatográfica, como por exemplo HPLC. Deste modo o perfil fitoquímico da *S. ramosissima* poderá ser conhecido com mais detalhe.

Muitos dos compostos isolados pertencem a famílias de compostos reconhecidas pelas suas atividades biológicas, por isso, seria interessante avaliar os efeitos biológicos do extrato de diclorometano da *S. ramosissima* e, se possível, dos compostos isolados, com particular destaque para o saliramofenol, pois as suas semelhanças estruturais com o BHT e o conhecimento de que alguns compostos naturais contendo grupos *terc*-butilo apresentam propriedades biológicas interessantes permite-nos prognosticar que este composto poderá ser biologicamente ativo, como por exemplo ser um bom antioxidante.

6. Referências bibliográficas

- [1] Verma, S.; Singh, S.P., "Current and future status of herbal medicines." *Vet. World*, **2008**, *1*, 347-350.
- [2] Newman, D.J.; Cragg, G.M., "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010." *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311–335.
- [3] Patwardhan, B.; Vaidya, A.D.B.; Chorghade, M., "Ayurveda and natural products drug discovery." *Curr. Sci.*, **2004**, *86*, 789-799.
- [4] Liebezeit, G., "Ethnobotany and phytochemistry of plants dominant in salt marshes of the Lower Saxonian Wadden Sea, southern North Sea." *Senck. Marit.*, **2008**, *38*, 1-30.
- [5] Davy, A.J.; Bishop, G.F.; Costa, C.S.B., "*Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball & Tutin, *S. nitens* P.W. Ball & Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball & Tutin and *S. dolichostachya* Moss)." *J. Ecol.*, **2001**, *89*, 681-707.
- [6] Isca, V.M.S.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S., "An overview of *Salicornia* genus: the phytochemical and pharmacological profile" em: *Natural Products: Research Reviews*, **2013**, Daya Publisher, Deli.
- [7] Wang, Q.-Z.; Liu, X.-F.; Shan, Y.; Guan, F.-Q.; Chen, Y.; Wang, X.-Y.; Wang, M.; Feng, X., "Two new nortriterpenoid saponins from *Salicornia bigelovii* Torr. and their cytotoxic activity." *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 742-749.
- [8] Bang, M.A.; Kim, H.A.; Cho, Y.J., "Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats." *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **2002**, *31*, 840-846.
- [9] Kong, C.S.; Kim, Y.A.; Kim, M.M.; Park, J.S.; Kim, S.K.; Lee, B.J.; Nam, T.J.; Seo, Y., "Antioxidant activity and inhibition of MMP-9 by isorhamnetin and quercetin 3-O- β -D-glucopyranosides isolated from *Salicornia herbacea* in HT1080 cells." *Food Sci. Biotechnol.*, **2008**, *17*, 983-989.
- [10] Al-Jaber, N.A.; Mujahid, T.G.; Al-Hazimi, H.M.G., "Secondary metabolites of Chenopodiaceae species." *J. Chem. Soc. Pakistan.*, **1992**, *14*, 76-83.

- [11] Castroviejo, S.; Laínz, M.; González, G.; Monseterrat, P.; Garmendia, F.; Paiva, J.; Vilar, L., *Flora Ibérica*, **1990**, Real Jardin Botanico, Madrid.
- [12] Franco, A.J., *Nova Flora de Portugal*, **1971**, Sociedade Astória, Lisboa.
- [13] Silva, H.; Caldeira, G.; Freitas, H., "*Salicornia ramosissima* population dynamics and tolerance of salinity." *Ecol. Res.*, **2007**, 22, 125-134.
- [14] Silva, H.; Freitas, H.; Caldeira, G., "Aspects of the population biology of *Salicornia ramosissima* from Aveiro Lagoon." *Rev. Biol.*, **1999**, 17, 193-202.
- [15] Kadereit, G.; Ball, P.B., S.; Mucina, L.; Sokoloff, D.; Teege, P.; Yaprak, A.E.; Freitag, H., "A taxonomic nightmare comes true: phylogeny and biogeography of glassworts (*Salicornia* L., Chenopodiaceae)." *Taxon*, **2007**, 56, 1143-1170.
- [16] Slenzka, A.; Mucina, L.; Kadereit, G., "*Salicornia* L. (Amaranthaceae) in South Africa and Namibia: rapid spread and ecological diversification of cryptic species." *Bot. J. Linn. Soc.*, **2013**, 172, 175-186.
- [17] Kadereit, G.; Piirainen, M.; Lambinon, J.; Vanderpoorten, A., "Cryptic taxa should have names: Reflections in the glasswort genus *Salicornia* (Amaranthaceae)." *Taxon*, **2012**, 61, 1227-1239.
- [18] Jefferies, R.L.; Gottlieb, L.D., "Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europaea* L. (*Sensu Stricto*) e *S. ramosissima* J. Woods." *New Phytol.*, **1982**, 92, 123-129.
- [19] Hupel, M.; Lecointre, C.; A., M.; Poupart, N.; Gall, E.A., "Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*." *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **2011**, 401, 36-47.
- [20] <http://www.biorede.pt/page.asp?id=933>. Acedido em: 30/07/2013.
- [21] <http://www.britannica.com/EBchecked/media/8426/Glasswort>. Acedido em: 13/02/2013.
- [22] Basham, Y.; Moreno, M.; Troyo, E., "Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp." *Biol. Fertil. Soils*, **2000**, 32, 265-272.
- [23] Rhee, M.H.; Park, H.J.; Cho, J.Y., "*Salicornia herbacea*: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant." *J. Med. Plants Res.*, **2009**, 3, 548-555.

- [24] Kong, C.S.; Kim, Y.A.; Kim, M.M.; Park, J.S.; Kim, J.A.; Kim, S.K.; Lee, B.J.; Nam, T.J.; Seo, Y., "Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells." *Toxicol. in Vitro*, **2008**, 22, 1742-1748.
- [25] Caçador, I.; Neto, J.M.; Duarte, B.; Barroso, D.V.; Pinto, M.; Marques, J.C., "Development of an Angiosperm Quality Assessment Index (AQuA-Index) for ecological quality evaluation of Portuguese water bodies—A multi-metric approach." *Ecol. Indic.*, **2013**, 25, 141-148.
- [26] Taghlidabad, H.R.; Hhodaverdiloo, H.; Manafi, S.; Rezapou, S., "Simultaneous uptake and accumulation of sodium and cadmium or lead by three halophyte plants in two calcareous soils " *Agri. Sci. Techn.*, **2012**, 25, 1299-1309.
- [27] Lin, Z.Q.; Schemenauer, R.S.; Cervinka, V.; Zayed, A.; Lee, A.; Teny, N., "Selenium volatilization from a soil-plant system for the remediation of contaminated water and soil in the San Joaquin Valley." *J. Environ. Qual.*, **2000**, 29, 1048-1056.
- [28] Jiang, D.; Huang, L.; Lin, S.; Li, Y., "Allelopathic effects of euhalophyte *Salicornia bigelovii* on marine alga *Skeletonema costatum*." *Allelopathy J.*, **2010**, 25, 163-172.
- [29] Jiang, D.; Huang, L.; Lin, Y.; Nie, L.; Lv, S.; Kuang, T.; Li, Y., "Inhibitory effect of *Salicornia europaea* on the marine alga *Skeletonema costatum*." *Sci. China Life Sci.*, **2012**, 55, 551-558.
- [30] Mudie, P.J.; Greer, S.; Brakel, J.; Dickson, J.H.; Schinkel, C.; Peterson-Welsh, R.; Stevens, M.; Turner, N.J.; Shadow, M.; Washington, R., "Forensic palynology and ethnobotany of *Salicornia* species (Chenopodiaceae) in northwest Canada and Alaska." *Can. J. Bot.*, **2005**, 83, 111-123.
- [31] Kim, J.Y.; Cho, J.Y.; Ma, Y.K.; Park, K.Y.; Lee, S.H.; Ham, K.S.; Lee, H.J.; Park, K.H.; Moon, J.H., "Dicaffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity." *Food Chem.*, **2011**, 125, 55-62.
- [32] Hedrick, U.P., *Sturtevant's edible plants of the world*, **1972**, Dover Publications, Inc, Nova York.
- [33] Mabey, R., *Flora Britannica*, **1996**, Reed International Books Ltd, Londres.
- [34] Pojar, J.; Mackinnom, A., *Plants of the Pacific Northwest coast*, **1994**, Lone Pine Publishing, Vancouver.
- [35] Im, S.A.; Kim, G.W.; Lee, C.K., "Immunomodulatory activity of *Salicornia herbacea* L. components." *Nat. Prod. Sci.*, **2003**, 9, 273-277.

- [36] Buchsbaum, R.; Valiela, I., "Variability in the chemistry of estuarine plants and its effect on feeding by Canada geese." *Oecologia*, **1987**, 73, 146-153.
- [37] Buchsbaum, R.; Valiela, I.; Swain, T., "The role of phenolic compounds and other plant constituents in feeding by Canada geese in a coastal marsh." *Oecologia*, **1984**, 63, 343-349.
- [38] El Shaer, H.M., "Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East region." *Small Rum. Res.*, **2010**, 91, 3-12.
- [39] Shahid, M.; Jarada, A.A.; Rao, N.K., "Use of marginal water for *Salicornia bigelovii* Torr. planting in the United Arab Emirates" em: *Developments in soil salinity assessment and reclamation*, **2013**, Springer, Dordrecht.
- [40] Lu, D.H.; Zhang, M.; Wang, S.J.; Cai, J.L.; Zhou, X.; Zhu, C.P., "Nutritional characterization and changes in quality of *Salicornia bigelovii* Torr. during storage." *LWT Food Sci. Technol.*, **2010**, 43, 519-524.
- [41] Yaprak, A.E.; Yurdakulol, E., "*Salicornia freitagii* (Chenopodiaceae), a new species from Turkey." *Ann. Bot. Fennici*, **2008**, 45, 207-2011.
- [42] Swingle, R.S.; Glenn, E.P.; Squires, V., "Growth performance of lambs fed mixed diets containing halophyte ingredients." *Anim. Feed Sci. Tech.*, **1996**, 63, 137-148.
- [43] Glenn, E.; O'Leary, J.W.; Watson, C.M.; Thompson, T.L.; Kuehl, R.O., "*Salicornia bigelovii* Torr. an oil seed halophyte for seawater irrigation." *Sci. China Life Sci.*, **1991**, 251, 1065-1067.
- [44] Glenn, E.P.; Brown, J.J.; O'Leary, J.W., "Irrigating crops with seawater." *Sci. Am.*, **1998**, 279, 76-81.
- [45] Glenn, E.P.; Brown, J.J.; Blumwald, E., "Salt tolerance and crop potential of halophytes." *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1999**, 18, 227-255.
- [46] Glenn, E.P.; Coates, W.E.; Riley, J.J.; Kuehl, R.O.; Swingle, R.S., "*Salicornia bigelovii* Torr. - a seawater-irrigated forage for goats." *Anim. Feed Sci. Tech.*, **1992**, 40, 21-30.
- [47] Attita, F.M.; Alsobayel, A.A.; Kriadees, M.S.; Al-Saiady, M.Y.; Bayoumi, M.S., "Nutrient composition and feeding value of *Salicornia bigelovii* Torr. meal in broiler diets." *Anim. Feed Sci. Tech.*, **1997**, 65, 257-263.
- [48] Jha, B.; Singh, N.P.; Mishra, A., "Proteome profiling of seed storage proteins reveals the nutritional potential of *Salicornia brachiata* Roxb., an extreme halophyte." *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 4320-4326.

- [49] Mishra, A.; Joshi, M.; Jha, B., "Oligosaccharide mass profiling of nutritionally important *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte." *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 92, 1942-1945.
- [50] Rosso, P.H.; Pushnik, J.C.; Lay, M.; Ustin, S.L., "Reflectance properties and physiological responses of *Salicornia virginica* to heavy metal and petroleum contamination." *Environ. Pollut.*, **2005**, 137, 241-252.
- [51] Milić, D.; Luković, J.; Ninkov, J.; Zeremski-Škorić, T.; Zorić, L.V., J.; Milić, S., "Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas." *Cent. Eur. J. Biol.*, **2012**, 7, 307-317.
- [52] <http://www.panoramio.com/photo/65154794>. Acedido em: 27/09/2012.
- [53] http://sophy.u-3mrs.fr/Photo-cp/Sag/Salicornia_perennis_____16_03_2003_4.JPG. Acedido em: 27/12/2011.
- [54] <http://blog.naver.com/PostView.nhn?blogId=init100&logNo=50073724015>. Acedido em: 13/02/2013.
- [55] <http://eol.org/pages/6887387/overview>. Acedido em: 30/01/2013.
- [56] http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?seq_num=431846&one=T. Acedido em: 30/07/2013.
- [57] <http://sbwildflowers.files.wordpress.com/2012/08/salicornia-pacifica-stem.jpeg>. Acedido em: 27/09/2012.
- [58] http://umramap.cirad.fr/amap2/logiciels_amap/Mangrove_web/especes/s/salbr/salbr_04.html. Acedido em: 27/09/2012.
- [59] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Salicornia_virginica.jpg. Acedido em: 27/09/2012.
- [60] Eganathan, P.; Subramanian, H.M.S.R.; Latha, R.; Rao, C.S., "Oil analysis in seeds of *Salicornia brachiata*." *Ind. Crop. Prod.*, **2006**, 23, 177-179.
- [61] Anwar, F.; Bhanger, M.I.; Nasir, M.K.A.; Ismail, S., "Analytical characterization of *Salicornia bigelovii* seed oil cultivated in Pakistan." *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4210-4214.
- [62] Austenfeld, F.-A., "Nutrient reserves of *Salicornia europaea* seeds." *Physiol. Plantarum*, **1986**, 68, 446-450.
- [63] Austenfeld, F.-A., "Seed dimorphism in *Salicornia*: nutrient reserves." *Physiol. Plantarum*, **1988**, 73, 502-504.
- [64] Guil, J.L.; Torija, M.E.; Giménez, J.J.; Rodríguez, I., "Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography." *J. Chromatogr. A* **1996**, 719, 229-235.

- [65] El-Shami, S.M.; El-Negoumy, S.I., "Tocopherols and flavonoids of SOS-7 halophyte." *Grasas Aceites*, **1993**, *44*, 249-252.
- [66] El-Mallah, M.H.; Murui, T.; El-Shami, S., "Detailed studies on seed oil of *Salicornia* SOS-7 cultivated at the Egyptian border of Red-Sea." *Grasas Aceites*, **1994**, *45*, 385-389.
- [67] Ha, B.J.; Lee, S.H.; Kim, H.J.; Lee, J.Y., "The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress." *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29*, 1305-1309.
- [68] Im, S.-A.; Kim, K.; Lee, C.-K., "Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*." *Int. Immunol.*, **2006**, *6*, 1451-1458.
- [69] Jang, H.S.; Kim, K.R.; Choi, S.W.; Woo, M.H.; Choi, J.H., "Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts." *Ann. Nutr. Metab.*, **2007**, *51*, 119-125.
- [70] Polat, R.; Satıl, F., "An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir - Turkey)." *J. Ethnopharmacol.*, **2012**, *139*, 626-641.
- [71] Lellau, T.F.; Liebezeit, G., "Activity of ethanolic extracts of salt marsh plants from the Lower Saxonian Wadden Sea Coast against microorganisms." *Senck. marit.*, **2003**, *32*, 177-181.
- [72] Lellau, T.F.; Liebezeit, G., "Cytotoxic and antitumor activities of ethanolic extracts of salt marsh plants from Lower Saxonian Wadden Sea, Southern North Sea." *Pharm. Biol.*, **2003**, *41*, 293-300.
- [73] Bhosale, S.H.; Jagtap, T.G.; Naik, C.G., "Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains." *Mycopathologia*, **1999**, *147*, 133-138.
- [74] Chandrasekaran, M.; Kannathasan; K.; Venkatesalu, V., "Antimicrobial activity of fatty acid methyl esters of some members of Chenopodiaceae." *Z. Naturforsch C.*, **2008**, *63*, 331-336.
- [75] Manikandan, T.; Neelakandan, T.; Ran, G.O., "Antibacterial activity of a halophyte *Salicornia Brachiata*." *J. Phytology*, **2009**, *1*, 441-444.
- [76] Khare, C.P., *Indian medicinal plants*, **2007**, Springer Science and Business Media, LLC, New York.
- [77] Daffodil, E.D.; Rajalakshmi, K.; Mohan, V.R., "Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids of *Salicornia brachiata* Roxb. leaf extracts (Chenopodiaceae)." *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2013**, *2*, 352-366.

- [78] Makhsous, S.G.; Heydarian, Z.; Shekarforoush, S., "Study the kinetic of in vitro antibacterial activity of *Salicornia* spp. against *Staphylococcus aureus* strains." *Res. Pharm. Sci.*, **2012**, 7, S805 (813th Iranian pharmaceutical science congress).
- [79] Makhsous, S.G.; Heydarian, Z.; Shekarforoush, S., "Study the kinetic of in vitro antibacterial activity of *Salicornia* spp. against *E. coli* strains." *Res. Pharm. Sci.*, **2012**, 7, S804 (813th Iranian pharmaceutical science congress).
- [80] Han, E.H.; Kim, J.Y.; Kim, H.G.; Chun, H.K.; Chung, Y.C.; Jeong, H.G., "Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages." *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, 183, 397-404.
- [81] Kang, S.; Kim, D.; Lee, B.H.; Kim, M.-R.; Chiang, M.; Hong, J., "Antioxidant proprieties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seeds extracts on human intestinal cells." *Food Sci. Biotechnol.*, **2011**, 20, 115-122.
- [82] Lee, Y.S.; Lee, S.; Lee, H.S.; Kim, B.K.; Ohuchi, K.; Shin, K.H., "Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rats lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues." *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, 28, 916-918.
- [83] Park, K.J.; Cho, M.H.; Kim, S.Y.; Lee, J.S., "Ameliorative effect of saltwort (*Salicornia herbacea*) extract on hepatic dysfunction and hyperlipidemia in rats." *Food Sci. Biotech.*, **2012**, 21, 331-337.
- [84] Essaidi, I.; Brahmi, Z.; Snoussi, A.; Koubaier, H.B.H.; Casabianca, H.; Abe, N.; Omri, A.E.; Chaabouni, M.M.; Bouzouita, N., "Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract." *Food Control.*, **2012**, 32, 125-133.
- [85] Im, S.-A.; Kim, G.-W.; Kim, J.-H.; Lee, C.-K., **2004**, "Composition for treating myeloid leukemia and increasing immunity comprising *Salicornia herbacea* extracts." Austrália, *Patente n° AU 2002349558*.
- [86] Bok, S.-H.; Choi, M.-S.; Jeong, T.-S.; Kim, E.-E.; Lee, S.-K., **2011**, "Food for preventing fatness and hyperlipemia." Coreia, *Patente n° EP1855549*.
- [87] Yu, X.; Zhang, Y.; Shao, R.; Xu, W., "Study on antibacterial and antioxidant activities on *Salicornia herbacea* extracts." *Adv. Mat. Res.*, **2012**, 421, 47-50.
- [88] Im, S.-A.; Lee, Y.-R.; Lee, Y.-H.; Oh, S.-T.; Gerelchuluun, T.; Kim, B.-H.; Kim, Y.; Yun, Y.-P.; Song, S.; Lee, C.-K., "Synergistic activation of monocytes by

- polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- γ ." *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *111*, 365-370.
- [89] Jo, Y.C.; Ahn, J.H.; Chon, S.M.; Lee, K.S.; Bae, T.J.; Kang, D.S., "Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.)." *Korean J. Med. Crop Sci.*, **2002**, *10*, 93-99.
- [90] Park, S.H.; Ko, S.K.; Choi, J.G.; Chung, S.H., "*Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice." *Arch. Pharm. Res.*, **2006**, *29*, 256-264.
- [91] Hwang, J.-Y.; Lee, S.-K.; Jo, J.-R.; Kim, M.-E.; So, H.-A.; Cho, C.-W.; Seo, Y.-W.; Kim, J.-I., "Hypolipidemic effect of *Salicornia herbacea* in animal model type 2 diabetes mellitus." *Nutr. Res. Pract.*, **2007**, *1*, 371-375.
- [92] Sung, J.H.; Park, S.H.; Seo, D.H.; Lee, J.H.; Hong, S.W.; Hong, S.S., "Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *salicornia herbacea*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2009**, *73*, 552-556.
- [93] <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=55189>. Acedido em: 13/02/2013.
- [94] <http://www.borghese-asia.com/html/eng/details.php?id=1217>. Acedido em: 15/02/2013.
- [95] Ferreira, D., "Potencialidades terapêuticas de *Salicornia ramosissima* em ratinhos." *Tese de Mestrado*, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, **2012**.
- [96] Renard, C.M.G.C.; Champenois, Y.; Thibault, J.F., "Characterization of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell-wall of glasswort, *Salicornia ramosissima*." *Carbohydr. Polym.*, **1993**, *22*, 239-245.
- [97] Borkowski, B.; Drost, K., "Alkaloide aus *Salicornia herbacea* L." *Pharmazie*, **1965**, *20*, 390-393.
- [98] Chiji, H.; Aiba, T.; Izawa, M., "Isolation and identification of two 2,3-unsubstituted chromones from glasswort (*Salicornia europaea* L.)." *Agric. Biol. Chem. Tokio*, **1978**, *42*, 159-1654.
- [99] Arakawa, Y.; Chiji, H., "Structural elucidation of two new chromones isolated from glasswort (*Salicornia europaea* L.)." *Agr. Biol. Chem. Tokio* **1983**, *47*, 2029-2033.
- [100] Arakawa, Y.; Asada, Y.-Z.; Ishida, H.; Chiji, H.; Izawa, M., "Structures of new two isoflavones and one flavanone from glasswort (*Salicornia europaea* L.)." *J. Fac. Agr. Kyushu U.*, **1982**, *61*, 1-12.

- [101] Geslin, M.; Verbist, J.-F., "Flavonoides de *Salicornia europaea*." *J. Nat. Prod.*, **1985**, 48, 111-113.
- [102] Yin, M.; Wang, X.; Wang, M.; Chen, Y.; Dong, Y.; Zhao, Y.; Feng, X., "A new triterpenoid saponin and other saponins from *Salicornia europaea*." *Chem. Nat. Compd.*, **2012**, 48, 258-261.
- [103] Tikhomirova, N.A.; Ushakova, S.A.; Tikhomirov, A.A.; Kalacheva, G.S.; Grosb, J.-B., "Possibility of *Salicornia europaea* use for the human liquid wastes inclusion into BLSS intrasystem mass exchange." *Acta Astronaut.*, **2008**, 63, 1106-1110.
- [104] Salt, T.A.; Adler, J.H., "Diversity of sterol composition in the family Chenopodiaceae." *Lipids*, **1985**, 9, 594-601.
- [105] Radwan, H.M.; Nazif, N.M.; Abou-Setta, L.M., "Phytochemical investigation of *Salicornia fruticosa* (L.) and their biological activity." *Res. J. Med. Med. Sci.*, **2007**, 2, 72-78.
- [106] Lee, Y.S.; Hye, S.L.; Kuk, H.S.; Kim, B.K.; Lee, S., "Constituents of the halophyte *Salicornia herbacea*." *Arch. Pharm. Res.*, **2004**, 27, 1034-1036.
- [107] Oh, J.-H.; Kim, E.-O.; Lee, S.-K.; Woo, M.-H.; Choi, S.-W., "Antioxidant activities of the ethanol extract of Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) cake prepared by enzymatic treatment." *Food Sci. Biotechnol.*, **2007**, 16, 90-98.
- [108] Bi, W.; Tian, M.; Row, K.H., "Separation of phenolic acids from natural plant extracts using molecularly imprinted anion-exchange polymer confined ionic liquids." *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1232, 37-42.
- [109] Han, D.; Tian, M.; Park, D.W.; Row, K.H., "Determination of organic acids in *Salicornia herbacea* by solid-phase extraction combined with liquid chromatography." *Nat. Prod. Commun.*, **2013**, 8, 203-206.
- [110] Park, S.H.; Kim, K.S., "Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L." *J. Korean Soc. Appl. Bi.*, **2004**, 47, 120-123.
- [111] Kong, C.-S.; Lee, J.I.; Kim, Y.A.; Kim, J.-A.; Bak, S.S.; Hong, J.W.; Park, H.Y.; Yea, S.S.; Seo, Y., "Evaluation on anti-adipogenic activity of flavonoid glucopyranosides from *Salicornia herbacea*." *Process Biochem.*, **2012**, 47, 1073-1078.
- [112] Chung, Y.C.; Chun, H.K.; Yang, J.Y.; Kim, J.Y.; Han, E.H.; Kho, Y.H.; Jeong, H.G., "Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*." *Arch. Pharm. Res.*, **2005**, 28.

- [113] Kim, Y.A.; Kong, C.-S.; Lee, J.I.; Kim, H.; Park, H.Y.; Lee, H.-S.; Lee, C.; Seo, Y., "Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 4318-4322.
- [114] Wang, X.; Zhang, M.; Zhao, Y.; Wang, H.; Liu, T.; Xin, Z., "Pentadecyl ferulate, a potent antioxidant and antiproliferative agent from the halophyte *Salicornia herbacea*." *Food Chem.*, **2013**, 141, 2066-2074.
- [115] Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr., G.M.; Charllyton, M.C.C.A.; Costa, L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H., "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais." *Quim. Nova*, **2007**, 30, 351-355.
- [116] Kong, C.-S.; Kim, J.-A.; Qian, Z.-J.; Kim, Y.A.; Lee, J.I.; Kim, S.-K.; Nam, T.J.; Seo, Y., "Protective effect of isorhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage." *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, 47, 1914-1920.
- [117] Hwang, Y.P.; Yun, H.J.; Choi, J.H.; Chun, H.K.; Chung, Y.C.; Kim, S.K.; Kim, B.-H.; Kwon, K.-i.; Jeong, T.C.; Lee, K.Y.; Jeong, H.G., "3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* inhibits tumor cell invasion by regulating protein kinase C- δ -dependent matrix metalloproteinase-9 expression." *Toxicol. Lett.*, **2010**, 198.
- [118] Chung, Y.C.; Choi, J.H.; Oh, K.N.; Chun, H.K.; Jeong, H.G., "Tungtungmadic acid isolated from *Salicornia herbacea* suppresses the progress of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice." *Toxicol. Res.*, **2006**, 22, 267-273.
- [119] Hwang, Y.P.; Yun, H.J.; Chun, H.K.; Chung, Y.C.; Kim, H.K.; Jeong, M.H.; Yoon, T.R.; Jeong, H.G., "Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage." *Chem. Biol. Interact.*, **2009**, 181, 366-376.
- [120] Hwang, Y.P.; Kim, H.G.; Choi, J.H.; Do, M.T.; Tran, T.P.; Chun, H.K.; Chung, Y.C.; Jeong, T.C.; Jeong, H.G., "3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* attenuates high glucose-induced hepatic lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the liver kinase B1 and silent information regulator T1/AMPK-dependent pathway." *Mol. Nutr. Food Res.*, **2013**, 57, 471-482.
- [121] Lee, K.Y.; Lee, M.H.; Chang, I.Y.; Yoon, S.P.; Lim, D.Y.; Jeon, Y.J., "Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*." *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, 103, 372-378.

- [122] Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X., "Modern analytical techniques in metabolomics analysis." *Analyst.*, **2011**, *137*, 293-300.
- [123] Westman-Brinkmalm, A.; Silberring, J.; Brinkmalm, G., "Separation methods" em: *Mass spectrometry : instrumentation, interpretation and applications*, **2009**, John Wiley & Sons, Inc., Nova Jersey.
- [124] Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; McEwen, C.N., *Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide*, **1996**, Academic Press, São Diego.
- [125] Murphy, R.C., *Handbook of lipid research 7*, **1993**, Plenum Press, Nova York.
- [126] Robbins, R.J., "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 2866-2887.
- [127] http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_xyz/index.htm. Acedido em: 20/01/2013.
- [128] Petersson, G., "Mass spectrometry of hydroxy dicarboxylic acids as trimethylsilyl derivatives: Rearrangement fragmentations " *Org. Mass Spectrom.*, **1972**, *6*, 565-576.
- [129] Petersson, G., "Mass spectrometry of alditols as trimethylsilyl derivatives." *Tetrahedron*, **1969**, *25*, 4437-4443.
- [130] Chuanphongpanich, S.; Tuwanon, N.; Buddhasukh, D.; Pirakltikuir, P.; Phanichphant, S., "Stanol synthesis from palm oil distillate." *J. Sci.*, **2006**, *33*, 109-116.
- [131] Elliott, W.H., "Identification of sterol and bile acids by computerized gas chromatography-mass spectrometry." *Lipids*, **1980**, *15*, 764-769.
- [132] Sparkman, O.D.; Penton, Z.E.; Kitson, F.G., "Steroids" em: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, **2011**, Academic Press, Oxford.
- [133] D'Oca, M.G.M.; Moróm-Villarreyes, J.A.; J.S., L.; Costa, C.S.B., "Fatty acids composition in seeds of the South American glasswort *Sarcocornia ambigua*." *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2012**, *84*, 865-870.
- [134] <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/search.aspx#&&query=sterol>. Acedido em: 27/02/2013.
- [135] Massey, I.J.; Djerassi, C., "Structural and stereochemical applications of mass spectrometry in the marine sterol field. Synthesis and electron impact induced mass spectral fragmentation of Δ^{24} - and $\Delta^{24(28)}$ - 3β -hydroxy- Δ^5 -sterols." *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 2448-2456.
- [136] Kutney, J.P.; Eigendorf, G., "Mass spectral fragmentation studies of triterpenes related to serratenediol." *Tetrahedron*, **1969**, *25*, 3753-3766.
- [137] <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Spectrums/040f4d48-3112-423a-a177-0cf380936f20.aspx>. Acedido em: 27/02/2013.

- [138] Taiz, L.; Eduardo, Z., "Secondary metabolites and plant defense" em: *Plant physiology*, **2006**, Sinauer Associates Inc., E.U.A.
- [139] Domingues, R.M.A.; Patinha, D.J.S.; Sousa, G.D.A.; Villaverde, J.J.; Silva, C.M.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P., "Eucalyptus biomass residues from agro-forest and pulping industries as sources of high-value triterpenic compounds." *Cellulose Chem. Technol.*, **2011**, 45, 475-481.
- [140] Domingues, R.M.A.; Sousa, G.D.A.; Silva, C.M.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P., "High value triterpenic compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal." *Ind. Crop. Prod.*, **2011**, 33, 158-164.
- [141] Villaverde, J.J.; Domingues, R.M.A.; Neto, C.P.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Ligerio, P.; Vega, A., "*Miscanthus x giganteus* extractives: A source of valuable phenolic compounds and sterols." *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 3626-3631.
- [142] Taiz, L.; Eduardo, Z., "Respiration and lipid metabolism" em: *Plant physiology*, **2006**, Sinauer Associates Inc., E.U.A.
- [143] Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M., "Lignin biosynthesis." *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2003**, 54, 519-546.
- [144] Lobo, A.M.; Lourenço, A.M., *Biossíntese de produtos naturais*, **2007**, Instituto Superior Técnico, Lisboa.
- [145] Zhang, X.; Guo, P.; Sun, G.; Chen, S.; Yang, M.; Fu, N.; Wu, H.; Xu, X., "Phenolic compounds and flavonoids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland." *J. Med. Plants Res.*, **2012**, 6, 2622-2626.
- [146] Daayf, F.; Bel-Rhlid, R.; Belanger, R.R., "Methyl ester of *p*-coumaric acid: A phytoalexin-like compound from long English cucumber leaves." *J. Chem. Ecol.*, **1997**, 23.
- [147] Vauzour, D.; Houseman, E.J.; George, T.W.; Corona, G.; Garnotel, R.; Jackson, K.G.; Sellier, C.; Gillery, P.; Kennedy, O.B.; Lovegrove, J.A.; Spencer, J.P.E., "Moderate Champagne consumption promotes an acute improvement in acute endothelial-independent vascular function in healthy human volunteers." *Brit. J. Nutr.*, **2010**, 1168-1178.
- [148] Vauzour, D.; Corona, G.; Spencer, J.P.E., "Caffeic acid, tyrosol and *p*-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity." *Arch. Biochem. Biophys.*, **2010**, 501, 106-111.

- [149] Ahn, B.Z.; Sok, D.E., "Michael acceptors as a tool for anticancer drug design " *Curr. Pharm. Design*, **1996**, 2, 247-262.
- [150] De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F., "Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-A review " *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18, 1672-1703
- [151] Sultana, R.; Ravagna, A.; Mohmmad-Abdul, H.; Calabrese, V.; Butterfield, D.A., "Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β -peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity." *J. Neurochem.*, **2005**, 92, 749-758.
- [152] Kosma, D.K.; Molina, I.; Ohlrogge, J.B.; Pollard, M., "Identification of an *Arabidopsis* fatty alcohol:caffeoyl-coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in root waxes." *Plant Physiol.*, **2012**, 160, 237-248.
- [153] Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P., "Demonstration of long-chain *n*-alkyl caffeates and Δ^7 -steryl glucosides in the bark of *Acacia* species by gas chromatography-mass spectrometry." *Phytochem. Analysis*, **2007**, 18, 151-156.
- [154] Serra, O.; Hohn, C.; Franke, R.; Prat, S.; Molinas, M.; Figueras1, M., "A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm." *Plant J.*, **2010**, 62, 277-290.
- [155] Gnonlonfin, G.J.B.; Sanni, A.; Brimer, L., "Review Scopoletin - A coumarin phytoalexin with medicinal properties." *Cr. Rev. Plant Sci.*, **2012**, 31, 47-56 (e referências citadas neste).
- [156] Capra, J.C.; Cunha, M.P.; Machado, D.G.; Zomkowski, A.D.; Mendes, B.G.; Santos, A.R.; Pizzolatti, M.G.; Rodrigues, A.L., "Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems." *Eur. J. Pharmacol.*, **2010**, 643, 232-238.
- [157] Kim, E.K.; Kwon, K.B.; Shin, B.C.; Seo, E.A.; Lee, Y.R.; Kim, J.S.; Park, J.W.; Park, B.H.; Ryu, D.G., "Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor κ B and caspase-3." *Life Sci.*, **2005**, 77, 824-836.
- [158] Kai, K.; Mizutani, M.; Kawamura, N.; Yamamoto, R.; Tamai, M.; Yamaguchi, H.; Sakata, K.; Shimizu, B., "Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of

- feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.*, **2008**, 55, 989-999.
- [159] Miller, D.; Sutcliffe, R.; Thauvette, J., "Striker stain formation in hardwoods: Isolation of scopoletin from sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.)." *Wood Sci. Technol.*, **1990**, 24, 339-344.
- [160] Edwards, R.; Stones, S.M.; Mellado, M.C.G.; Jorin, J., "Characterization and inducibility of a scopoletin degrading enzyme from sunflower." *Phytochemistry*, **1997**, 45, 1109-1114.
- [161] Silva, W.P.K.; Deraniyagala, S.A.; Wijesundera, R.L.C.; Karunanayake, E.H.; Priyanka, U.M.S., "Isolation of scopoletin from leaves of *Hevea brasiliensis* and the effect of scopoletin on pathogens of *H. brasiliensis*." *Mycopathologia*, **2001**, 153, 199-202.
- [162] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spectroscopic methods in organic chemistry*, **1997**, Thieme, Nova York.
- [163] Bisel, P.; Al-Momani, L.; Muller, M., "The tert-butyl group in chemistry and biology." *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2655-2665.
- [164] Chevallier, C.; Richardson, A.D.; Edler, M.C.; Hamel, E.; Harper, M.K.; Ireland, C.M., "A new cytotoxic and tubulin-interactive milnamide derivative from a marine sponge *Cymbastela* sp." *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3737-3739.
- [165] Matsunaga, S.; Fusetai, N.; Konosu, S., "Bioactive marine metabolites VII. Structures of discodermins B, C, and D, antimicrobial peptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*." *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 855-856.
- [166] Nakanishi, K., "The ginkgolides." *Pure Appl. Chem.*, **1967**, 14, 89-114.
- [167] Vogensen, S.B.; Stromgaard, K.; Shindou, H.; Jaracz, S.; Suehiro, M.; Ishii, S.; Shimizu, T.; Nakanishi, K., "Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet activating factor (PAF) receptor antagonists." *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 601-608.
- [168] Nakanishi, K.; Habaguchi, K.; Nakadaira, Y.; Woods, M.C.; Maruyama, M.; Major, R.T.; Alauddin, M.; Patel, A.R.; Weinges, K.; Baehr, W., "Structure of bilobalide, a rare tert-butyl containing sesquiterpenoid related to the C20-ginkgolides." *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 3544-3546.
- [169] Giner, J.L., "Biosynthesis of marine sterol side chains." *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1735-1752.

- [170] Giner, J.L.; Djerassi, C., "Biosynthesis of 24-methylene-25-methylcholesterol in *Phaseolus vulgaris*." *Phytochemistry*, **1991**, 30, 811-814.
- [171] Moore, B.S.; Hertweck, C., "Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units." *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19, 70-99.
- [172] Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Cavaleiro, J.A.S., "Lipophilic extractives of the inner and outer barks of *Eucalyptus globulus*." *Holzforschung*, **2002**, 56, 372-379.
- [173] Ekman, R., "The suberin monomers and triterpenoids from the outer bark of *Betula verrucosa* Ehrh." *Holzforschung*, **1983**, 37, 205-211.